

Actividades glicosidasas sobre el xiloglucano de la  
pared celular de *Arabidopsis thaliana*



**Natalia Iglesias Méndez**

**Santiago de Compostela, 2008**



**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

**FACULTADE DE BIOLOXÍA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLOXÍA VEXETAL**

***Actividades glicosidasas sobre el xiloglucano de la pared celular de *Arabidopsis thaliana****

**Memoria que presenta para optar al grado de Doctora en Biología**

**NATALIA IGLESIAS MÉNDEZ**

**Santiago de Compostela, 2008**

Los doctores D. Ignacio Zarra Cameselle, catedrático de Fisiología Vegetal de la Universidad de Santiago de Compostela, y Dña. Gloria Revilla López, profesora titular del Departamento de Fisiología Vegetal de la Universidad de Santiago de Compostela

CERTIFICAN QUE:

D. Natalia Iglesias Méndez realizó bajo nuestra dirección, en el Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología (Universidad de Santiago de Compostela), el trabajo titulado “Actividades glicosidasas sobre el xiloglucano de la pared celular de *Arabidopsis thaliana*”, que presenta para optar al grado de Doctora en Biología.

El Director

La Directora

Fdo: Ignacio Zarra Cameselle

Fdo: Gloria Revilla López

La Doctoranda

Fdo: Natalia Iglesias Méndez

## Capítulo I: Introducción general

I.1. Introducción general.....	1
I.2. Objetivos.....	28

## Capítulo II: $\beta$ -glucosidasas de *Arabidopsis thaliana*

II.1. Introducción.....	31
II.2. Materiales y métodos.....	33
II.2.1. Material vegetal.....	33
II.2.2. Análisis filogenético.....	35
II.2.3. Extracción de RNA total.....	35
II.2.4. Síntesis de cDNA.....	36
II.2.5. PCR semi-cuantitativa en tiempo real.....	36
II.2.6. Obtención del extracto apoplástico.....	38
II.2.7. Preparación de XXXG.....	38
II.2.8. Actividad apoplástica frente a XXXG.....	38
II.2.9. Siembra de mutantes.....	39
II.2.10. Análisis de paredes celulares de hojas.....	39
II.2.11. Análisis de oligosacáridos de xiloglucano: MALDI-TOF MS.....	40
II.2.12. Análisis de componentes principales.....	40
II.3. Resultados y discusión.....	41
II.3.1. $\beta$ -glucosidasas de la familia 3 de las glicosil hidrolasas en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	41
II.3.2. PCR semi-cuantitativa en tiempo real.....	43
II.3.3. Actividad apoplástica frente a XXXG.....	45
II.3.4. Análisis de mutantes <i>knockout</i> mediante MALDI-TOF MS.....	47
II.3.5. Análisis de componentes principales.....	49



### Capítulo III: Estudio de mutantes knockout de las $\beta$ -glucosidasas de *Arabidopsis thaliana*

III.1. Introducción.....	55
III.2. Materiales y métodos.....	57
III.2.1. Material biológico utilizado.....	57
III.2.2. Actividad $\beta$ -glucosidasa frente a xiloglucano.....	57
III.2.3. Extracción de DNA.....	58
III.2.4. Análisis de los mutantes mediante PCR.....	58
III.2.5. Niveles de transcritos.....	60
III.2.6. Análisis fenotípico de los mutantes seleccionados.....	60
III.2.7. Amplificación de la región promotora de los genes de interés.....	61
III.2.8. Clonación en el vector pCambia 1381z T-DNA.....	61
III.2.9. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por electroporación.....	63
III.2.10. Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	64
III.2.11. Selección y cultivo de plantas.....	64
III.2.12. Tinción y fijado de las muestras.....	64
III.2.13. Fijación e inclusión de muestras para microscopía.....	65
III.3. Resultados y discusión.....	66
III.3.1. Actividad de los mutantes <i>knockout</i> frente al sustrato XXXG.....	66
III.3.2. Análisis del mutante <i>Atbglc1 4D</i> mediante PCR.....	69
III.3.3. Expresión del gen <i>AtBGLC2</i> en el mutante <i>Atbglc1 4D</i> .....	71
III.3.4. Análisis fenotípico de los mutantes del gen <i>AtBGLC1</i> .....	72
III.3.5. Análisis de expresión de los genes <i>AtBGLC1</i> y <i>AtBGLC2</i> .....	75
III.3.6. Fenotipo histológico del mutante <i>Atbglc1 4D</i> .....	77

### Capítulo IV: $\beta$ -galactosidasas de *Arabidopsis thaliana*

IV.1. Introducción.....	85
IV.2. Materiales y métodos.....	88
IV.2.1. Árbol filogenético de las $\beta$ -galactosidasas.....	88
IV.2.2. Material vegetal.....	88
IV.2.3. PCR semi-cuantitativa en tiempo real.....	91
IV.2.4. Obtención del extracto apoplástico.....	92

IV.2.5. Preparación de sustratos: XLLG y XLFG.....	92
IV.2.6. Análisis de paredes celulares de hojas.....	93
IV.2.7. Análisis de oligosacáridos mediante MALDI-TOF.....	94
IV.2.8. Análisis de componentes principales.....	94
IV.2.9. Análisis de la actividad $\beta$ -galactosidasa de los mutantes.....	94
IV.2.10. Análisis fenotípico de los mutantes seleccionados.....	95
IV.2.11. Análisis bioinformático de expresión de las diferentes $\beta$ -galactosidasas.....	96
IV.3. Resultados y discusión.....	97
IV.3.1. $\beta$ -galactosidasas de la familia 35 de las glicosil hidrolasas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	97
IV.3.2. Análisis bioinformático de expresión de las $\beta$ -galactosidasas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	98
IV.3.3. PCR semi-cuantitativa en tiempo real.....	101
IV.3.4. Análisis de los mutantes <i>knockout</i> de $\beta$ -galactosidasas mediante MALDI-TOF.....	103
IV.3.5. Análisis de componentes principales.....	105
IV.3.6. Análisis mediante MALDI-TOF de la actividad $\beta$ -galactosidasa.....	106
IV.3.7. Análisis fenotípico de los mutantes seleccionados.....	111
<i>Capítulo V: Discusión general</i> .....	119
<i>Capítulo VI: Conclusiones</i> .....	126
<i>Bibliografía</i> .....	131







## I.1. Introducción general

### Pared Celular Vegetal

Las células de las plantas están rodeadas por una resistente, flexible y polimérica pared que determina su forma (Bacic y col., 1988) y su tamaño. Les permite soportar una alta presión para que puedan desarrollarse y les confiere importantes propiedades mecánicas, contribuyendo a mantener la integridad de la planta completa. De hecho, las propiedades físicas de los distintos tejidos vegetales están determinadas en gran medida por la composición y estructura de sus paredes celulares.

Aunque inicialmente se consideró la pared celular como una estructura rígida e inerte, con posterioridad se comprobó que puede estar implicada en gran cantidad de procesos dinámicos. La presión osmótica aporta rigidez a las células mediante la tensión que crea sobre la pared. Cada célula está adherida a la adyacente mediante polisacáridos pécticos que normalmente evitan que las células se separen bajo presiones elevadas. Las paredes celulares son capaces de llevar a cabo modificaciones controladas que permitan a la célula crecer de forma polarizada. Debido a que las paredes de

las células adyacentes se unen, esta extensión coordinada es necesaria. En principio el mecanismo de extensión de la pared está determinado genéticamente, pero además, debe ser capaz de responder a cambios ambientales, para que la planta pueda adaptarse a las condiciones variables de su entorno.

La pared celular es la principal estructura implicada en procesos de crecimiento celular en plantas, puesto que en ella se llevan a cabo los procesos de incorporación y reorganización de nuevos materiales, y está formada por una serie de capas. La primera que se forma es la *lámina media*, constituida por polisacáridos pécticos y responsable de la unión entre las células. Posteriormente entre la lámina media y la membrana plasmática se deposita la *pared celular primaria*, que se forma en los estados juveniles y posee capacidad de extensión, incrementando rápidamente su superficie durante el crecimiento celular (Hayashi, 1989). En algunos tipos celulares especializados se deposita una tercera capa por debajo de la pared celular primaria que es la *pared celular secundaria*, más rígida y que ya no posee capacidad de crecimiento (Brett y Waldron, 1996) (Fig. I.1).

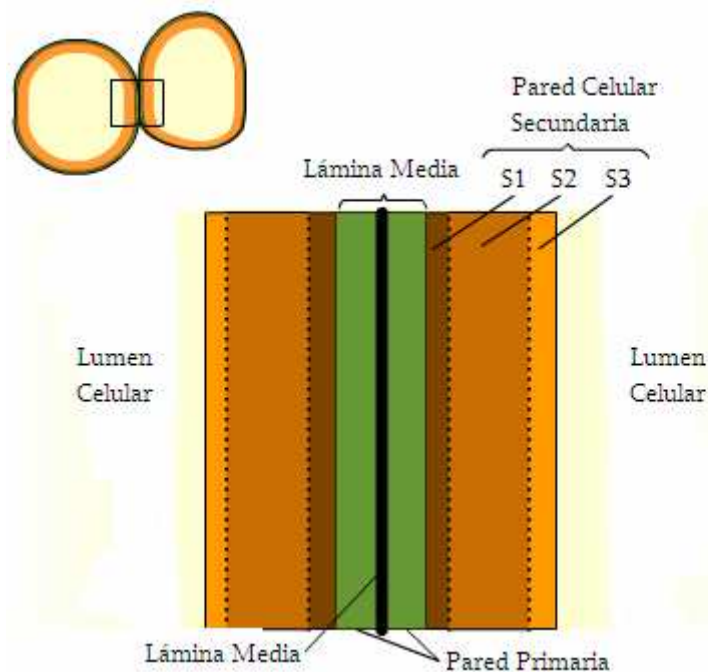


Figura I.1. Disposición de la pared celular primaria, lámina media y pared celular secundaria. Adaptado de <http://www.biologia.edu.ar>

Ambos tipos de pared difieren además en su composición, ya que la pared celular primaria está compuesta mayoritariamente por celulosa, hemicelulosas, pectinas y en menor proporción proteínas y bajos niveles de lignina, en cambio, la pared celular secundaria presenta diferente composición dependiendo del tejido al que pertenezca, y en general presenta altos niveles de lignina, que le aporta rigidez. Por lo tanto, para estudiar el crecimiento de las células vegetales debemos centrarnos en la pared celular primaria, debido a su capacidad de extenderse bajo la acción de la presión de turgencia permitiendo el incremento del volumen celular. Se puede afirmar entonces

que la pared aporta fuerza, extensibilidad y capacidad de modulación a la célula.

### Pared Celular Primaria

La pared celular primaria de dicotiledóneas tipo I, como *Arabidopsis thaliana*, se define como una estructura polimérica y altamente organizada formada por una red tridimensional de microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz compleja y altamente hidratada de polisacáridos (hemicelulosas y pectinas), proteínas (estructurales y enzimáticas), y fenoles. En algunos tipos celulares especializados también están presentes sustancias como la lignina, cutina, suberina o sílice (Fry, 2004) (Fig. I.2).

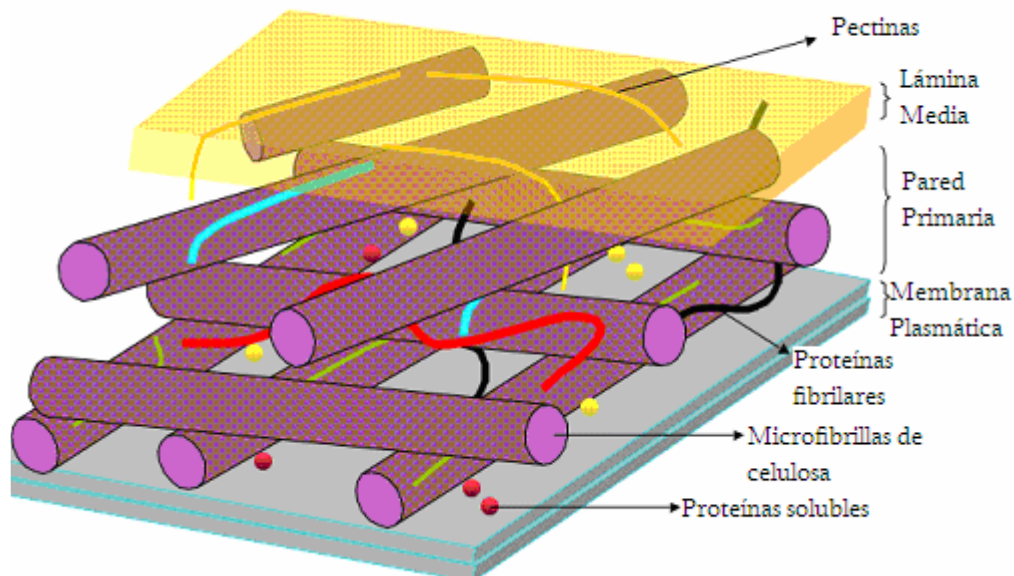


Figura I.2. Estructura de la pared celular primaria, se muestra la unión entre las cadenas de XyG (rojo) y las microfibrillas de celulosa (lila), además de la red de pectinas (amarillo) y de proteínas fibrilares (negro) y solubles (circulares).

En general, se considera que aproximadamente el 90% del peso seco de las paredes celulares primarias correspondería a los polisacáridos (celulosa, hemicelulosas y pectinas) mientras que el 10% restante correspondería a las proteínas (estructurales y enzimáticas). Las microfibrillas de celulosa está interconectadas a través de polisacáridos hemicelulósicos como el xiloglucano (XyG) o el arabinoxilano dando lugar a una red celulosa/hemicelulosa (Carpita y Gibeaut, 1993). Existe otra red formada por polisacáridos pécticos (homogalacturonano, ramnogalacturonano I y ramnogalacturonano II y arabinogalactanos), que contribuyen a la rigidez de la pared mediante enlaces por

puentes de calcio entre las cadenas de homogalacturonano (Jarvis, 1984) o puentes difenil entre arabinogalactanos.

Entre las funciones de la pared primaria en las células vegetales, está la de conferir protección mecánica a la célula, regulando al mismo tiempo su forma y su volumen (Bacic y col., 1988). Constituye un soporte físico, aportándole a la célula cierto grado de rigidez (Taiz, 1984). Actúa como defensa frente al ataque de patógenos y como barrera reguladora de procesos de transporte (Goldberg, 1985). Puede actuar además como lugar de almacenamiento de reservas (Reid, 1984), o como fuente de moléculas con actividad biológica (Ryan, 1990).



## Celulosa

La celulosa es el componente mayoritario de las paredes celulares de las plantas superiores, se estructura en forma de cadenas lineales no ramificadas constituidas por restos de glucosa unidos mediante enlaces  $\beta(1-4)$ , con una rotación de  $180^\circ$  entre un resto y el siguiente, estabilizados mediante puentes de hidrógeno intramoleculares. Estas cadenas lineales de glucosa se disponen paralelamente unidas entre si mediante puentes de hidrógeno dando lugar a microfibrillas, cada una de las cuales tiene aproximadamente 36 cadenas

lineales (Delmer, 1999), con un diámetro de entre 5 y 15 nm (Mccann y col., 1990b). No se conoce con exactitud la longitud de las microfibrillas de celulosa, puesto que es variable, pero algunos glucanos simples contienen más de 14000 unidades de glucosa, lo que correspondería a una microfibrilla de aproximadamente 7  $\mu\text{m}$  (Fig. I.3).

La biosíntesis de celulosa tiene lugar en la superficie externa de la membrana plasmática, catalizada por un complejo multienzimático que consta de 6 subunidades en forma de roseta (Fig. I.4).

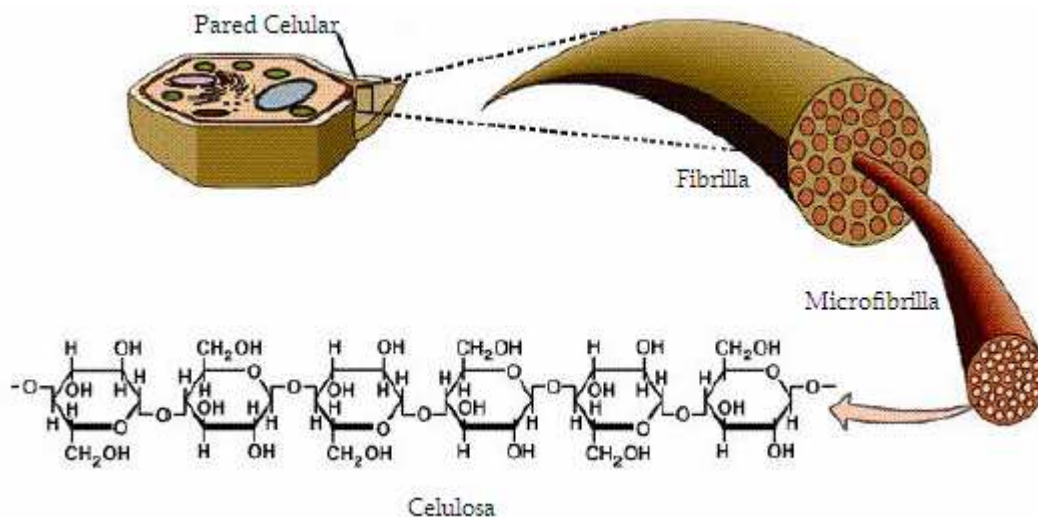


Figura I.3. Estructura de las microfibrillas de celulosa, formadas por restos de glucosa, que forman parte de pared celular. Adaptado de <http://www.ualr.edu>

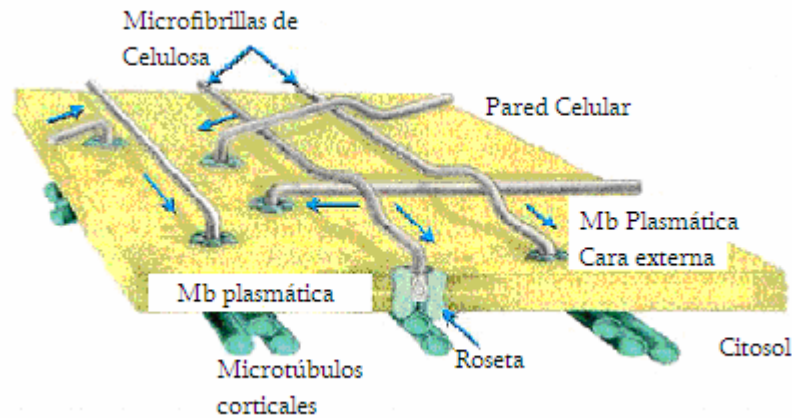


Figura I.4. Las microfibrillas de celulosa son sintetizadas por complejos enzimáticos situados en la membrana plasmática. Estos complejos están formados por moléculas de celulosa sintasa que se disponen formando rosetas embebidas en la membrana. Las microfibrillas se van alargando por el extremo por el que están unidas a las rosetas. Las rosetas a su vez, se mueven por la membrana guiadas por microtúbulos que se encuentran en la cara interior de esta.

Cada subunidad estaría formada a su vez por seis celulosa sintasas, capaces de utilizar UDP-glucosa como sustrato y unirlo al extremo no reductor de la cadena de  $\beta$ -glucano (Brown y Saxena, 2000). Con 36 subunidades, cada roseta podría producir 36 cadenas de celulosa simultáneamente, que se organizarían a la salida de la roseta para dar lugar a la microfibrilla. A finales de los 90 fueron identificados los genes de la celulosa sintasa (*CesA*) (Pear y col., 1996), en *Arabidopsis thaliana*. La familia CesA cuenta con 10 genes, que se expresan en distintos tejidos y tipos celulares. Estas proteínas CesA están embebidas en la membrana plasmática formando las agrupaciones hexagonales que dan lugar a las denominadas rosetas (Kimura y col., 1999). Los complejos celulosa sintasa deben contener otras proteínas que favorezcan

su unión con los microtúbulos para que puedan ser guiados a lo largo de la membrana (Lloyd y Chan, 1989). Cada una de las proteínas CesA que constituye una roseta sintetizaría las 6 cadenas de glucano simultáneamente, de manera, que a partir de cada roseta se formarían las 36 cadenas mencionadas (Brown y Saxena, 2000). Es posible que hemicelulosas como el XyG sean atrapadas en las microfibrillas durante su formación, provocando regiones desordenadas (Hayashi, 1989). La molécula que según estudios recientes iniciaría la cadena de glucano es un esterol-glucósido que funcionaría como aceptor inicial para la elongación de la cadena. Los esteroides son componentes lipídicos de las membranas celulares vegetales y los esterol- $\beta$ -glucósidos son comúnmente sintetizados en las membranas plasmáticas, donde las proteínas

CesA pueden usar un esterol-glucósido y uridina 5'-difosfato-Glc para formar glucanos cortos unidos a esterol (Peng y col., 2002). Esta teoría se ve apoyada por el hecho de que defectos en la síntesis de esterol provocan una reducción en el contenido de celulosa de la pared (Schrack y col., 2004).

Para que la síntesis de celulosa se lleve a cabo de forma correcta es imprescindible una actividad de edición, que realiza una endo-1,4- $\beta$ -glucanasa de membrana denominada KORRIGAN (Zuo y col., 2000). Aunque su función no se conoce con exactitud, se ha propuesto que es necesaria para la correcta terminación de la cadena una vez sintetizada, liberando un oligo precursor unido a la membrana lipídica (Gillmor y col., 2002). Los mutantes *kor* tienen defectos en la citoquinesis y elongación celular y a pesar de que sintetizan  $\beta(1-4)$ glucano este no cristaliza de forma correcta en la microfibrilla. Pese a esto, la proteína no está asociada a las rosetas (Zuo y col., 2000) y los mutantes *kor* tienen niveles normales de esterol-glucósido (Robert y col., 2004).

Las microfibrillas de celulosa se disponen de forma diferente dependiendo del tipo celular, así, en células de tallos y raíces que son alargadas, presentan una disposición perpendicular al eje de crecimiento y paralela entre si, sin embargo en células isodiamétricas las microfibrillas se disponen de forma

irregular. Por lo tanto la localización de las microfibrillas no es al azar sino funcional, ya que un alineamiento perpendicular de las mismas es propicio para un crecimiento longitudinal de la célula (Carpita y Gibeaut, 1993). Es probable que la disposición de las microfibrillas sea producto de la interacción de los microtúbulos con el complejo de la celulosa sintasa, ya que los microtúbulos suelen encontrarse dispuestos perpendicularmente a las zonas de elongación celular, de forma que serían los responsables de guiar a las celulosa sintasas a medida que estas sintetizan moléculas de celulosa. Esto explicaría que las microfibrillas se dispongan en la misma dirección que los microtúbulos, es decir, perpendicular al eje de crecimiento (Delmer, 1999).

### Hemicelulosas

Las hemicelulosas son polisacáridos formados por una cadena lineal relativamente larga sobre la que aparecen distintas cadenas laterales relativamente cortas. Pueden unirse a las microfibrillas de celulosa mediante puentes de hidrógeno. Entre las hemicelulosas presentes en la pared celular, están los xilanos (como el arabinoxilano), el xiloglucano, y el glucano mixto que está presente sólo en gramíneas.

## El Xiloglucano

El Xiloglucano (XyG) es la hemicelulosa más abundante en las paredes celulares primarias de dicotiledóneas como *Arabidopsis thaliana*.

Está formado por glucosas unidas mediante un enlace  $\beta(1-4)$  formando una cadena lineal con una longitud de entre 300 y 3000 unidades de glucosa (Fry, 1989). La mayoría de los restos de glucosa están unidos a restos de xilosa mediante enlace  $\alpha(1-6)$ , lo que impide la formación de microfibrillas. Estas cadenas laterales no aparecen aleatoriamente, en general aparecen tres restos de glucosa sustituidos y el cuarto resto sin sustituir (Vincken y col., 1997) (Fig. I.5).

De este modo la actividad de las endo- $\beta$ -(1-4)glucanasas da lugar a la formación de oligosacáridos de xiloglucano que normalmente

tienen cuatro glucosas, aunque en algunas especies aparecen oligosacáridos con dos o cuatro glucosas (Hoffman y col., 2005). Algunos de los residuos de xilosa unen a su vez galactosa, y estos a su vez, pueden tener unida fucosa (Hayashi y col., 1980; Hayashi y MacLachlan, 1984; O'Neill y Selvendran, 1983; Nishitani y Masuda, 1982, 1983).

En la nomenclatura abreviada de los oligosacáridos se utiliza una letra para cada glucosa de eje principal, que indica la cadena lateral que lleva unida (Fry y col., 1993). Por convenio, la nomenclatura de los oligosacáridos empieza siempre por el extremo no reductor (Tabla I.1).

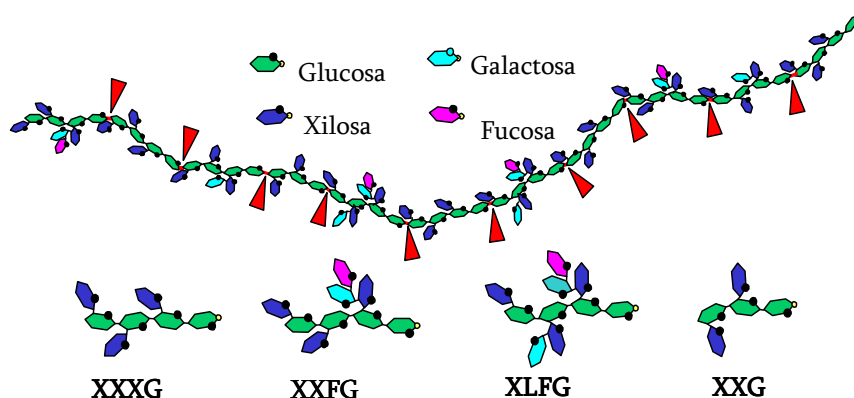


Figura I.5. Estructura de la molécula de xiloglucano, se muestran los oligosacáridos más comunes resultado de la actividad hidrolítica de las  $\beta(1\rightarrow4)$ -glucanasas. En la parte inferior aparecen los oligosacáridos más abundantes que se obtienen tras la digestión del xiloglucano de guisante con endoglucanasa, con su correspondiente nomenclatura abreviada.

Nomenclatura	Cadena lateral
<b>G</b>	Ninguna
<b>X</b>	$\alpha$ -D-xilosil
<b>L</b>	$\beta$ -D-galactosil-(1-2)- $\alpha$ -D-xilosil
<b>F</b>	$\alpha$ -L-fucosil-(1-2)- $\beta$ -D-galactosil-(1-2)- $\alpha$ -D-xilosil
<b>S</b>	$\alpha$ -L-arabinosil-(1-2)- $\alpha$ -D-xilosil
<b>T</b>	$\alpha$ -L-arabinosil-(1-3)- $\alpha$ -L-arabinosil-(1-2)- $\alpha$ -D-xilosil
<b>J</b>	$\alpha$ -L-galactosil-(1-2)- $\beta$ -D-galactosil-(1-2)- $\alpha$ -D-xilosil

Tabla I.1. Nomenclatura abreviada de la estructura de los oligosacáridos de xiloglucano.

La estructura y distribución molecular de las cadenas laterales varía en distintos tejidos y plantas. La estructura química y distribución de las cadenas laterales ha sido rigurosamente establecida mediante análisis de los oligosacáridos de xiloglucano que son obtenidos mediante digestión del polímero con endoglucanasa. Por ejemplo, en el caso del guisante, tras la degradación del xiloglucano polimérico, los oligosacáridos que mayoritariamente se obtienen son XXXG y XXFG, que se van alternando a lo largo de la molécula (Hayashi y Maclachlan, 1984). Un análisis más detallado permitió descubrir cantidades menores de: XXLG, XLFG, XXG, XG, GXFG y GXXG (Guillén y col., 1995).

Estas cadenas laterales determinan la estructura del xiloglucano y las distintas funciones biológicas que presenta.

La síntesis de xiloglucano como la de la mayoría de polisacáridos de la pared, tiene lugar en el aparato de Golgi (Zhang y Staehelin, 1992), desde donde se liberan a la pared mediante vesículas de secreción. Parece que el primer paso en la síntesis de xiloglucano es la formación del esqueleto glucosa-xilosa, que da como resultado la estructura básica XXXG. En la actualidad han sido identificadas la mayor parte de las glicosil-transferasas implicadas en la biosíntesis de xiloglucano (Fig. I.6).

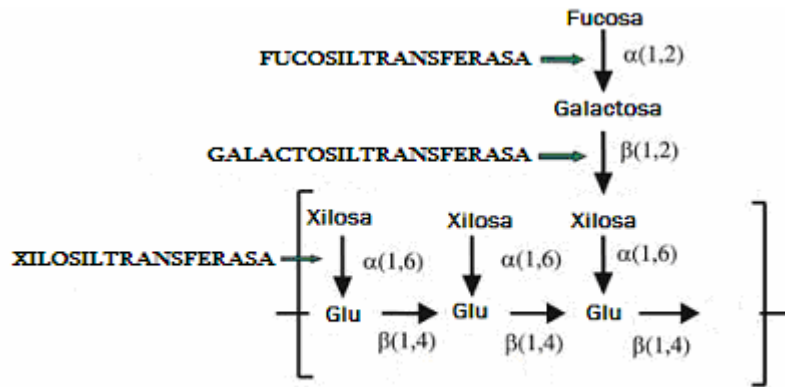


Figura I.6. Se indican los puntos de actuación de algunas de las enzimas implicadas en la síntesis de xiloglucano, que añaden monosacáridos activados a las nuevas cadenas en síntesis. Adaptado de <http://www.prl.msu.edu/cellwallnet.shtml>

Las glicosil-transferasas constituyen el mecanismo central de la biosíntesis de polisacáridos (Scheible y Pauly, 2004). Estas glicosil-transferasas están codificadas por genes denominados *CSL* (Cellulose synthase like genes) que se denominan según la homología de su secuencia con los genes *CESA*. Los genes *CSL* encontrados en *Arabidopsis* y arroz, han sido subdivididos en ocho grupos basados en su secuencia génica. Las proteínas CSL contienen patrones de secuencia característicos de las β-glicosiltransferasas, que son consideradas buenas candidatas para las sintasas localizadas en el aparato de Golgi. Estas proteínas

formarían el eje β-glicano de las hemicelulosas como XyG, xilano o mananos entre otros.

Además de las sintasas que ensamblan el eje de los polisacáridos matriciales se requieren otras glicosiltransferasas para añadir ramificaciones laterales a estos glicanos, algunas de ellas han sido identificadas (Scheible y Pauly, 2004).

En el proceso de síntesis de xiloglucano interviene un complejo multienzimático que coordina las actividades glicosiltransferasa y xilosiltransferasa. El siguiente paso de la síntesis sería la unión de residuos de fucosa y galactosa, que deben estar activados para incorporarse al eje XXXG (Faik y col., 1997a).

Dicha activación consiste en la unión a la glucosa, galactosa y xilosa de una molécula de UDP (Uridina 5' difosfato), mientras que en el caso de la fucosa la activación se lleva a cabo mediante la unión de una molécula de GDP (Guanina 5' difosfato). Estos precursores son transportados desde el citosol al aparato de Golgi mediante transportadores (Gibeaut, 2000), desde donde serán liberados al apoplasto. Han sido identificadas algunas de las enzimas implicadas en estas reacciones, una fucosil-transferasa (Faik y col., 1997b; Perrin y col., 1999) y una galactosil-transferasa (Madson y col., 2003) identificada a partir del mutante de *Arabidopsis mur3*. Además, el eje principal de glucano que constituye el xiloglucano, está sustituido por restos de xilosa en un patrón regular. Dichas xilosas son agregadas al menos por una, y probablemente por dos o tres enzimas, denominadas xilosil-transferasas (Cavalier y Keegstra, 2006). Se han aislado siete genes candidatos a codificar las enzimas que catalizan dicha actividad, de los cuales uno en *Arabidopsis* (*AtXT1*) se confirmó que codifica para una proteína con actividad xilosil-transferasa (Faik y col., 2002). La proteína codificada por el gen *AtXT2*, presenta la misma especificidad de aceptor que *AtXT1* y además genera los mismos productos *in vitro*. La presencia de cadenas fucosiladas en un amplio rango de especies, desde el pino (gimnospermas) o leguminosas (dicotiledóneas)

hasta la cebolla (monocotiledóneas) sugiere su importancia en la función del xiloglucano. Sin embargo, plantas de *Arabidopsis thaliana* correspondientes al mutante *mur2*, que carecen de actividad *AtFUT1*, responsable de la transferencia de fucosa al xiloglucano, crecen de forma normal en condiciones de laboratorio (Perrin y col., 2003).

El xiloglucano, además de presentar diferentes cadenas laterales, en algunos de sus residuos aparece *O*-acetilación. Estos grupos acetilo están presentes en el C2, C3 y C6 de los residuos de galactosa y pueden contener uno o dos grupos acetilo (York y col., 1993). Se han descrito grupos acetilo en el C6 de algunas glucosas (York y col., 1996). Tanto los grupos acetilo unidos a los residuos de glucosa como las cadenas laterales limitan los posibles lugares de hidrólisis del polímero. De ahí que el XyG de lugar a diferente composición de oligosacáridos tras tratamiento con endocelulasa dependiendo de los lugares de acetilación.

La acetilación de los residuos de galactosa aparece considerablemente reducida en los mutantes deficientes en fucosa *AtFUT1*, *mur1* y *mur2*, que sintetizan poco o nada de fucosa. Esto sugiere que la fucosilación del xiloglucano es necesaria para al menos una *O*-acetiltransferasa en *Arabidopsis* (Perrin y col., 2003).

## Pectinas

Son los polisacáridos más solubles de la pared celular y pueden ser extraídos con agua caliente o agentes quelantes de calcio. Al igual que las hemicelulosas, las pectinas también forman un grupo heterogéneo de polisacáridos. Constituyen aproximadamente el 30% del peso seco de la pared de dicotiledóneas y están implicadas en las uniones intercelulares ya que están presentes en la lámina media y en la pared celular primaria, podrían tener además un papel en el control de la porosidad celular

(Somerville y col., 2004). Las pectinas podrían estar relacionadas con el cese del crecimiento de la pared debido un incremento de la rigidez, que frenaría el crecimiento, mediante la dimerización de los ácidos hidroxycinámicos que forman parte de su estructura (Zarra y col., 1999). La característica principal de las pectinas es que contienen azúcares ácidos como el ácido glucurónico y el ácido galacturónico, y es precisamente esta acidez, la que permite la formación de complejos debido a la unión mediante puentes de calcio (Fig. I.7).

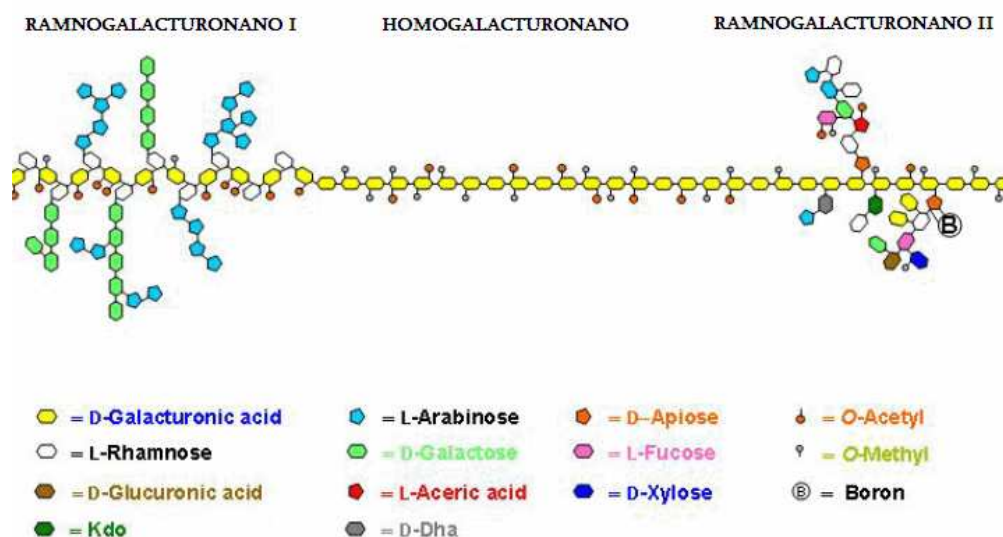


Figura I.7. Dominios principales de pectinas y estructura básica.

Algunas pectinas tienen una estructura primaria sencilla, como el homogalacturonano (HG), que es un polímero lineal formado por restos de ácido galacturónico (GalU) unidos por un enlace  $\alpha(1-4)$ . El ramnogalacturonano I (RG I), es una pectina formada por la repetición del

disacárido  $(1-2)\alpha\text{-L-Rha}(1-4)\alpha\text{-D-GalU}$ , donde los restos de Rha funcionan como anclaje de largas cadenas laterales de arabinanos y/o arabinogalactanos. El tamaño de esta pectina en los entrenudos de guisante durante el crecimiento está entre 500 y 2000 kDa (Talbot



y Ray, 1992). La tercera pectina importante es el ramnogalacturonano II (RGII). Es un polisacárido pequeño pero de estructura muy compleja formada por GalU, Rha, Ara, Gal y pequeñas cantidades de azúcares poco frecuentes como apiosa o ácido acérico. El arabinogalactano del RGII presenta ramificaciones en C3 y C6 de Gal y en C3 y C5 de Ara (Ridley y col., 2001). Las cadenas laterales contienen un alto número de residuos distintos unidos mediante diversos enlaces pero aun así el RGII tiene una estructura altamente conservada y puede formar dímeros mediante un puente borato, con dos enlaces éster (Fleischer y col., 1999). Recientemente se ha sugerido que el RGI sería el componente al que se unirían otras pectinas tales como el HG o el RGII unidas covalentemente como cadenas laterales.

La síntesis de pectinas al igual que la de otros polisacáridos de la pared se lleva a cabo en el aparato de Golgi. Las proteínas que intervienen en la síntesis presentan en su mayoría segmentos transmembrana o forman complejos con otras proteínas implicadas en este proceso, por este motivo su purificación se complica. Al no haber mutantes específicos, resulta difícil el estudio de la biosíntesis y de su papel *in vivo*. Por esta razón, los genes implicados en la síntesis de pectinas que conocemos se han identificado a partir de mutantes de la pared que presentan pectinas

con estructura alterada (Somerville y col., 2004). Quasimodo, un mutante de T-DNA de *Arabidopsis*, tiene inactivado el gen de una posible glucuronosil-transferasa de pectinas (Bouton y col., 2002). Las paredes celulares de este mutante presentan adherencia celular reducida y una reducción del 25% en los niveles de ácido galacturónico comparado con el tipo salvaje. Sin embargo, en estas plantas, el resto de los azúcares pécticos no aparecen en menor cantidad, por eso los autores suponen que esta actividad glucuronosil-transferasa es específica del homogalacturonano pero no afecta al RG II.

### Proteínas Estructurales

La pared celular primaria contiene una cantidad mayor de proteínas que la pared celular secundaria. Se pueden distinguir básicamente dos tipos de proteínas de pared, las estructurales y las enzimáticas. Las proteínas estructurales más conocidas están relacionadas con el cese de la extensión de la pared y en su gran mayoría contienen un aminoácido inusual, la hidroxiprolina y se caracterizan por la presencia de secuencias repetitivas. Las más conocidas son las *glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) o extensinas*, en las que la secuencia repetitiva es Ser-(HO-Hyp)<sub>4</sub>, de forma que un 40% de sus aminoácidos corresponde a hidroxiprolina y el resto serían mayoritariamente serina y lisina. Los residuos

de hidroxiprolina pueden unirse a oligosacáridos de arabinosa, que formarían la parte glicídica, mientras que los residuos de serina serían puntos de unión para residuos de galactosa. Además contienen abundantes residuos de tirosina, los cuales parecen estar implicados en la formación de enlaces isoditirosina que son propuestos como responsables de la insolubilización de las HRGPs en la pared (Lamport y Epstein, 1983). El estudio de las extensinas ha demostrado que cada una de ellas es sintetizada en uno o pocos tipos celulares en la planta.

La función de las extensinas está claramente implicada en el cese del crecimiento de la pared celular (Lamport y Kieliszewski, 1994), la expresión de las expansinas no sólo está regulada por el desarrollo sino también por el ataque de patógenos. Se considera que las HRGPs son un componente importante del mecanismo de defensa, ya que su expresión no sólo se produce cuando cesa el crecimiento sino también tras una infección de las células epidérmicas o corticales, lo que demuestra que son componentes de un mecanismo de resistencia (Keller, 1993).

Las extensinas se localizan distribuidas uniformemente en la pared primaria y están ausentes en la lámina media. Esto pone en evidencia que estas proteínas son producidas por cada célula de forma independiente y no

pueden atravesar la lámina media que separa células vegetales adyacentes (Stafstrom y Staehelin, 1988).

Otro tipo de proteínas estructurales son las *proteínas ricas en glicina (GRPs)* y en *prolina (PRPs)*. Las *proteínas ricas en glicina* presentan repeticiones del tipo (Gly-X)<sub>n</sub>, donde frecuentemente X es glicina, aunque también puede ser alanina o serina, y su función está relacionada con el sistema vascular y la curación de heridas. Las *proteínas ricas en prolina* presentan repeticiones Pro-Pro-X-Y-Lys, donde X e Y pueden ser valina, tirosina, histidina y ácido glutámico. Parecen estar implicadas en procesos de lignificación (Ye y col., 1991) y se expresan en determinados tipos celulares o solamente en un tipo celular en cierto estado de desarrollo.

Las *arabinogalactanoproteínas (AGPs)* son proteínas solubles y glicosiladas (Fincher y col., 1983; Showalter, 1993). Se han encontrado múltiples formas de las AGPs en tejidos vegetales, en la pared o asociadas a la membrana plasmática y presentan patrones de expresión diferentes dependiendo del tipo de célula y tejido (Pennell y col., 1989; Serpe y Nothnagel, 1995). Presentan un dominio central rico en hidroxiprolina (Hyp) y una secuencia de anclaje a la membrana plasmática en el extremo C-terminal. También presentan una especial unión a las pectinas, por ello se piensa que podrían estar implicadas en la

adhesión celular, sin embargo no son un componente estructural importante en la célula. Las AGPs intervendrían también en otras funciones tales como crecimiento, nutrición, así como en otros procesos de desarrollo (Pennell y Roberts, 1990).

### **Enzimas de la Pared Celular**

Además de las proteínas estructurales, en la pared celular destacan las proteínas con actividad enzimática que catalizan al menos cuatro tipos de reacciones, transglicosilación, hidrólisis, desesterificación y reacciones redox (Fry, 1995). Casi todas estas enzimas son proteínas glicosiladas que intervienen en el metabolismo de la pared celular (Fry, 1988) aunque su función puede ser muy diferente. Estas enzimas pueden ser solubles en el apoplasto o bien estar unidas a la pared celular. Se caracterizan por presentar mayor estabilidad que las enzimas citoplásmicas y por actuar sobre sustratos simples como el  $O_2$ ,  $H_2O_2$  o  $H_2O$  (Fry, 1995).

Son numerosas las enzimas que pueden encontrarse asociadas a la pared celular (Cassab y Varner, 1988; Fry, 1995). Algunas pueden modificar los polisacáridos de la pared celular, por ejemplo, las endoglucanasas, xilosidasas, pectinasas, pectin-metil-esterasas o xiloglucano endotransglicosilasas. Otras pueden actuar en la pared como potenciales defensas frente a patógenos fúngicos o bacterianos, es el caso de

las quitinasas o las  $\beta(1-3)$ glucanasas, o modificar distintos sustratos en la pared, como las peroxidasas o las fosfatasas. La función precisa de muchas enzimas de la pared aun está por determinar, pero sin duda intervienen en numerosos procesos, desde la modificación de la pared hasta el transporte de metabolitos o la señalización celular. Toda esta diversidad de enzimas apoya el hecho de que la pared es un compartimento metabólico muy activo en la célula, y el flujo de materiales a través de la membrana plasmática puede modular la actividad de las enzimas de la pared.

Todas las enzimas han de estar reguladas ya que de lo contrario, la elevada actividad glicanasa podría llevar a cabo la degradación de componentes de la pared celular provocando su desintegración. El mecanismo que regula estas actividades enzimáticas de la pared celular, no se conoce con exactitud, lo que si es indiscutible es la necesidad de dicha regulación.

### **Ensamblaje y Estructura de la Pared Celular**

Después de su secreción al espacio extracelular, los polímeros que constituyen la pared se ensamblan de forma cohesiva, para dar lugar a la estructura final característica de la pared. Una vez sintetizados dichos polímeros tienden a agregarse para dar lugar a estructuras organizadas (Roland y col., 1977; Lapasin y Pricl, 1995). De hecho, cuando la celulosa es

regenerada *in vitro* forma fibras espontáneamente. Además, cuando se disuelve la fracción hemicelulósica de la pared y posteriormente se precipita, se agrega formando redes ordenadas y concéntricas similares a las de las paredes originales (Roland y col., 1977). Las pectinas, por el contrario forman redes isotrópicas mucho más dispersas. Aunque el xiloglucano, en general, está fuertemente unido a la pared, una vez solubilizado no forma fácilmente agregados de nuevo, y los complejos formados con la celulosa *in vitro* son menos estables que los que se forman en la pared celular *in vivo* (Hayashi, 1989; Hayashi y col., 1994). Los complejos xiloglucano-celulosa, de los que se hablará con detalle posteriormente, reconstituidos *in vitro*, contienen sólo un 7% del xiloglucano encontrado en los complejos nativos (Hayashi y col., 1987), esto implica que se requieren determinadas condiciones físicas para formar la estructura que presenta la pared *in vivo*. Una interpretación posible es que el xiloglucano se entrelaza con las microfibrillas de celulosa durante su síntesis (Hayashi y col., 1994). Los enlaces que forma el xiloglucano con la celulosa no son mecánicamente fuertes, sino que son enlaces débiles, fáciles de romper, permitiendo el crecimiento de la pared, y a su vez numerosos, aportando resistencia mecánica global a la pared.

En el ensamblaje de la pared también hay enzimas implicadas, aunque no se conocen

muchas que sean específicas para la unión de polímeros de la pared. Las candidatas potenciales para esta función son las xiloglucano endotransglicosilasas (XETs), las esterases o las oxidasas entre otras. La XET (Fry y col., 1992; Nishitani y Tominaga, 1992), cataliza la ruptura de cadenas de xiloglucano (entre un resto de glucosa no sustituido y el siguiente) y la unión del nuevo extremo reductor formado al extremo no reductor de una cadena de xiloglucano aceptora. Originalmente se propuso que esta transglicosilasa podría relajar la pared de forma limitada y controlada, aunque los experimentos *in vitro* no pudieron detectar la relajación de la pared por acción de la XET (McQueen-Mason y col., 1993). Un papel alternativo de la XET puede ser el integrar nuevos XyGs sintetizados en la pared (Nishitani y Tominaga, 1991; Okazawa y col., 1993). Los XyGs sintetizados son más pequeños que los que constituyen la pared (Talbot y Ray, 1992). Por otro lado, la composición de XyG de diferentes tamaños varía a lo largo de diferentes segmentos del tallo de guisante, y puede cambiar de forma rápida y reversible en respuesta a la auxina, cortes o cambios de turgencia (Nishitani y Masuda, 1981; Nishitani y Masuda, 1983; Talbot y Ray, 1992). Sería la XET la que provocaría estos cambios en la composición de oligosacáridos de XyG, ya que rompería cadenas de XyG para dar lugar a fragmentos de diferentes tamaños. En

solución, la XET parece cortar al azar en diferentes localizaciones a lo largo de la cadena principal del XyG, aunque probablemente las condiciones de la pared celular, como la conformación del propio XyG o el ambiente electrostático de la pared modulan la acción de esta enzima para formar fragmentos más grandes o más pequeños de XyG. Por lo tanto esta enzima tendría capacidad para alterar la matriz que constituye la pared, y además podría realizar tres funciones diferentes. La más importante sería la que tiene que ver con la biosíntesis y modulación de la pared, ya que esta no puede perder grosor, y por ello será necesario incorporar nuevo material a la pared en expansión. Entonces, las cadenas de XyG de nueva síntesis son liberadas al apoplasto, procedentes del aparato de Golgi, y entrelazadas a las cadenas ya existentes gracias a estas enzimas, manteniendo así la integridad de la pared celular (Nishitani, 1997).

La deposición de nuevo material en la pared es claramente necesaria para mantener la fuerza e integridad de la misma durante el crecimiento. Aunque *in vitro* se ha podido separar la extensión de la pared de la deposición (Rayle y col., 1970) parece que ambos son inseparables *in vivo*. Por ello se cree que la deposición de nuevo material en la pared permitiría deslizarse entre si a los componentes de la pared ya existentes, aunque no existen evidencias demostradas para explicar la

inducción a la extensión de la pared por incorporación de nuevos polímeros secretados.

A microscopía electrónica la estructura dominante que se observa en la pared celular primaria es una trama de microfibrillas de celulosa, que presentan un diámetro de unos 3 nm y que se extienden sobre las células, manteniéndose unidas mediante hemicelulosas, tales como el xiloglucano, pectinas y proteínas, a modo de gel, puesto que el agua representa un alto porcentaje en el contenido global de dicha matriz (Carpita y Gibeaut, 1993). Estaría formada por tres redes relativamente independientes: red xiloglucano-celulosa, matriz de pectinas y glicoproteínas estructurales (Carpita y Gibeaut, 1993).

La mayoría de los polímeros que constituyen la pared durante el crecimiento no están unidos covalentemente, y la integridad de la pared se mantiene mediante una gran cantidad de uniones no covalentes entre estos polímeros. Esto implica que la integridad y propiedades mecánicas de la pared estarían determinadas por tres factores: el tamaño de los polímeros de la pared, el grado de entrecruzamiento de los polímeros y la interacción entre ellos. Cambios en estos tres factores, en teoría, podrían alterar la extensibilidad de la célula aunque estaría implicada también alguna actividad enzimática (Fry, 1998).

El modelo de pared primaria más aceptado (Carpita y Gibeaut, 1993) considera que la red xiloglucano-celulosa es la principal responsable de las propiedades mecánicas de la pared, siendo el xiloglucano el componente que soportaría la mayor parte de la tensión. Como ya se ha mencionado, las cadenas de xiloglucano se unen a las microfibrillas de celulosa mediante puentes de hidrógeno, de forma que una cadena de xiloglucano se une a varias microfibrillas, al tiempo que una microfibrilla estaría unida a su vez a numerosas cadenas de xiloglucano.

Como se ha comentado previamente, las microfibrillas de celulosa se sintetizan en la membrana plasmática y son insolubles, porque las cadenas laterales de glucanos unidas mediante puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals dan lugar a estructuras cristalinas formadas por cadenas laterales, mientras que los demás polímeros son secretados en forma soluble, para que puedan difundir a lo largo de la pared hasta su destino final. Algunos polímeros son insolubles cuando se extraen de la pared, por ello se piensa que podrían ser modificados tras la secreción, por eliminación de los componentes estructurales que favorecían dicha secreción (Somerville y col., 2004). Se ha propuesto que algunos polímeros darían lugar a polisacáridos de mayor tamaño (y menos solubles) tras la liberación a la pared.

Los estudios sobre la composición de azúcares de paredes de distintos tejidos de *Arabidopsis* han demostrado que cada tejido presenta distinta composición polisacáridica. Estudios inmunológicos utilizando anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes epitopos de los polisacáridos proporcionan ejemplos de la diferenciación espacial y temporal de los polisacáridos de la pared. Estos y otros estudios demuestran que la composición de la pared está altamente controlada en los distintos tipos celulares en relación con el crecimiento y el desarrollo. Los estudios inmunológicos han demostrado además que diversos polímeros no están distribuidos uniformemente dentro de la pared. El RGII, por ejemplo, aparece en mayor proporción cerca de la membrana plasmática, mientras que el HG aparece mayoritariamente en la lámina media donde contactan las paredes de células adyacentes. Estas diferencias en composición y estructura en las paredes de distintas células, podría indicar diferencias en las necesidades de elasticidad de dichas células, la movilidad de distintos tipos de moléculas en las paredes celulares o la respuesta a patógenos.

### **La Red Xiloglucano-Celulosa**

Como se ha mencionado en el apartado anterior, la pared celular primaria está formada por tres redes relativamente independientes: red de pectinas, glicoproteínas estructurales, y

la red xiloglucano-celulosa (Carpita y Gibeau, 1993). No se conoce con exactitud la interrelación entre esta última red y la matriz de pectinas, pero aproximadamente una tercera parte del xiloglucano estaría covalentemente unido a pectinas (Thompson y Fry, 2000). Aunque la celulosa y el xiloglucano se sintetizan y ensamblan en diferentes localizaciones, hay una estrecha interacción entre ambos polisacáridos *in vivo*. El xiloglucano previene la formación de complejos más grandes de celulosa (McCann y col., 1990a; Acebes y col., 1993), y además hay muy pequeñas cantidades de celulosa libres (Hayashi y MacLachlan, 1984). La red xiloglucano-celulosa parece ser el factor más importante que controla la extensión de la pared celular, de tal modo que posee la capacidad de regular el crecimiento celular. Parece que el xiloglucano tendría un papel estructural importante en la determinación de la orientación de las microfibrillas de celulosa y la formación de la red (Hanus y Mazeau, 2006). El xiloglucano se une a celulosa mediante puentes de hidrógeno, y se ha demostrado que se necesita una cadena de xiloglucano de al menos 5 residuos glicosil consecutivos para que pueda unirse. Esta unión estaría afectada además, por el grado de ramificación de la molécula, de forma que el tipo de cadena lateral que presenta determina una unión más o menos fuerte. La presencia de fucosa en el xiloglucano de la pared celular

primaria, favorece que adopte una conformación plana que facilita la unión del xiloglucano a la celulosa (Levy y col., 1991). De hecho, Levy y colaboradores (1991) utilizando programas informáticos para obtener predicciones conformacionales, describieron una velocidad de unión del xiloglucano fucosilado a la celulosa superior con respecto al que no lo está, demostrando posteriormente sus teorías en ensayos *in vitro* (Levy y col., 1997). Sin embargo, nuevos trabajos informáticos han visto estas predicciones como no reales, y no han encontrado a nivel teórico cambios en la adsorción de la celulosa por parte de los oligos fucosilados con respecto a los no fucosilados (Hanus y Mazeau, 2004). Por otro lado, se ha demostrado que la presencia de residuos de galactosa limita la unión del xiloglucano a la celulosa, e *in vitro*, la modificación del xiloglucano por acción de una  $\beta$ -galactosidasa incrementa la unión del xiloglucano a la celulosa (Reid y col., 1988), aunque además del tamaño, la configuración de las cadenas laterales también puede jugar un papel importante en la adsorción del xiloglucano a la celulosa. Cuando el xiloglucano excede la capacidad de unión de la celulosa, se produce una adsorción preferencial de las moléculas más grandes, ya que su unión es más favorable en términos de entropía.

La red xiloglucano-celulosa es, por lo tanto, esencial para comprender los procesos de

extensión, pero hay que tener en cuenta otros componentes de la pared (Cosgrove, 1987). Se ha observado que la celulosa no parece sufrir grandes modificaciones durante el crecimiento (Fry, 1988), por lo que es en la red en la que se producen los cambios. El xiloglucano participa en el mantenimiento de la estructura de la pared celular, de modo que un menor grado de polimerización (Lorences y Zarra, 1987; Lorences y col., 1989) implicaría una disminución en el número de puentes de hidrógeno que le unen a la celulosa, facilitando su desplazamiento bajo la presión de turgencia y por lo tanto el crecimiento.

#### **Enzimas que actúan sobre la red Xiloglucano-Celulosa**

Sobre la red Xiloglucano-Celulosa actúan enzimas incluidas dentro de tres grupos fundamentales:

- ◆ XTHs (Xiloglucano endotransglicosilasas/hidrolasas) (Rose y col., 2002a), pertenecientes a la familia 16 de las glicosil hidrolasas (Henrissat, 1991).
- ◆ Celulasas o endo- $\beta$ -(1-4)glucanasas (del Campillo, 1999) pertenecientes a la familia 9 de las glicosil hidrolasas (Henrissat, 1991)
- ◆ Expansinas (Cosgrove, 2000)

Cuando actúan como xiloglucano endotransglicosilasas, las *XTHs*, rompen las cadenas de xiloglucano y se mantienen unidas

al extremo no reductor recién formado en dicha cadena. Posteriormente transfieren dicho extremo al extremo no reductor de una cadena preexistente, recién sintetizada o a un oligosacárido de xiloglucano. La unidad mínima aceptora es el oligosacárido XXG. Se puede establecer por lo tanto, dos tipos de transglicosilaciones (Nishitani, 1998), una *integradora*, mediante la cual se incorporan nuevas cadenas de xiloglucano recién sintetizadas a las cadenas preexistentes, y otra *reestructuradora*, que da lugar a la modificación de las cadenas de xiloglucano ya existentes, de forma que se utilizaría dichas cadenas, con función tanto donadora como aceptora. Esta característica de las XTHs es fundamental en el proceso de extensión de la pared, ya que permite la relajación de la misma sin provocar su desestabilización completa. Las XTHs pueden actuar, por lo tanto, como endoglucanasas, XEH, ya que rompen xiloglucano de una cadena donadora, o como transglicosilasas, XET, ya que vuelven a unir ese extremo reductor al extremo no reductor de otra molécula de xiloglucano. No obstante, sería esta última actividad la que daría lugar a la pérdida de rigidez de la pared, al romper las cadenas de xiloglucano, unir las de nuevo dando lugar a moléculas más largas y permitiendo la separación de las moléculas de celulosa (Thompson y Fry, 2001). Si se une la cadena de xiloglucano aceptora a un oligo soluble,



entonces se produce la rotura de la cadena (Fig | I.8).

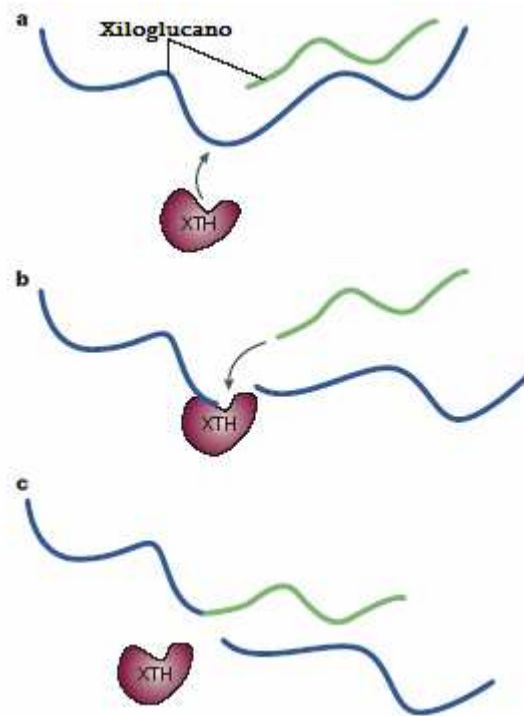


Figura I.8. Actividad endotransglicosilasa de la XTH, que corta y une cadenas de xiloglucano, permitiendo la expansión de la pared celular, debido a la posibilidad de separación de las microfibrillas de celulosa. (a) cadenas de xiloglucano (b) la XTH corta la cadena de xiloglucano dando lugar a un extremo reductor (c) la XTH une dicho extremo con el extremo no reductor de otra cadena de xiloglucano.

En relación a la capacidad de usar un oligosacárido como aceptor, se podría decir que esto permitiría una mayor extensión de la pared, ya que al unirse las cadenas portadas por la XTHs impedirían que estas se uniesen a las cadenas preexistentes aumentando así el espacio entre las microfibrillas. De esta forma, la concentración de oligosacáridos suficiente para competir con las cadenas preexistentes podría influir de manera importante en los mecanismos de extensión de la pared celular.

Se estudió la preferencia de las XTHs por diferentes moléculas aceptoras, y parece que existe una amplia gama de isoenzimas en función de dichas preferencias (Rose y col., 2002b). Esto podría significar que el tipo de oligosacárido o el tipo de xiloglucano presente en la pared en un determinado momento del desarrollo sería determinante en la consecución del estado requerido. En cuanto a la relación de estas isoenzimas con el crecimiento, se encontró una buena correlación entre los

niveles de actividad de las XTHs y la tasa de crecimiento (Potter y Fry, 1993; Catala y col., 1997; Takano y col., 1999). Pero curiosamente, al añadir XTHs a paredes aisladas no se consiguió la extensión esperada (McQueen-Mason y col., 1993). Pese a que las expansinas han sido propuestas para llevar a cabo la extensión de la pared celular, las XTHs estarían también implicadas en dicha función. La expresión de algunos genes de XTHs se han correlacionado a menudo con el crecimiento, además una expresión baja de los genes *AtXTH18* y *AtXTH27* da lugar a cambios fenotípicos. Estas observaciones apoyan la idea de que las XTHs están implicadas en la relajación de la pared celular (Van Sandt y col., 2007). El grupo I purificado de XTH, presenta exclusivamente actividad XET, y puede estimular la extensión de paredes celulares tipo I. No se puede generalizar dicha actividad para todas las XTHs, ya que pueden estar especializadas funcionalmente al igual que pasa con las expansinas (Choi y col., 2006). La diversidad funcional es sugerida por los patrones de expresión de varios genes de XTH, incluso en tejidos que no se expanden (Vissenberg y col., 2005; Becnel y col., 2006). Cada XTH debe ser analizada de forma individual para revelar su papel exacto en la mecánica de la pared celular.

Las *endocelulasas* o *endo- $\beta$ -(1-4)-glucanasas* son enzimas que rompen los enlaces  $\beta$ (1-4)

entre glucosas no sustituidas. Se supone, en principio, que estas enzimas actúan sobre moléculas de celulosa, aunque en plantas no se han encontrado celulasas activas frente a celulosa cristalizada. Además tampoco se han encontrado dominios de unión a celulosa (Brumell y col., 1994). En cambio, sí se ha encontrado actividad frente a derivados solubles de celulosa. Existe una correlación entre la liberación de oligosacáridos de xiloglucano y la actividad de las endoglucanasas (Ohmiya y col., 2000). Junto con esta liberación se produce la solubilización de las cadenas de xiloglucano, lo cual facilitaría la extensión de la pared.

Algunos investigadores se inclinan por pensar que el verdadero sustrato de las celulasas son las moléculas de xiloglucano. Sin embargo, ensayos de actividad enzimática frente a esta molécula muestran que dicha actividad sobre ella es escasa (Ohmiya y col., 1995) o nula (O'Donoghue y Huber, 1992). También existen datos a favor de esta hipótesis, ya que se ha encontrado en guisante una endocelulasa activa frente a xiloglucano y no frente a celulosa soluble (Matsumoto y col., 1995), aunque no se sabe si pertenece a la familia de las celulasas. En numerosas ocasiones, sin embargo, se asume que el principal sustrato de las celulasas es el xiloglucano, a pesar de que las enzimas tienen más actividad frente a carboximetil celulosa (Hayashi, 1989).

En cuanto a las *expansinas*, poco después del descubrimiento de las XTHs, fueron purificadas estas proteínas capaces de provocar, por sí solas, la extensión de paredes aisladas sometidas a tensión, en las que previamente se inactivaron por calor todas las enzimas nativas (McQueen-Mason y col., 1992). No se sabe realmente como actúan estas proteínas, aunque en principio romperían puentes de hidrógeno entre las microfibrillas de celulosa y las moléculas de xiloglucano. Al parecer sólo son capaces de romper estos enlaces cuando las moléculas de xiloglucano están en tensión y sería esta tensión la que evitaría que volvieran a unirse mediante puentes de hidrógeno. También se comprobó su actividad en células

vivas, donde inducen la extensión de la pared celular (Link y Cosgrove, 1998; Fleming y col., 1999), lo que indicaría que el nivel de expansinas es un factor limitante del crecimiento (Fig. I.9).

La acción combinada de las expansinas y las XTHs, daría lugar a una relajación de la pared que permitiría el crecimiento celular, así pues, la rotura de alguna cadena de xiloglucano por parte de las XTHs, propiciaría un distanciamiento entre las microfibrillas, produciéndose así la tensión necesaria para que las expansinas rompan los puentes de hidrógeno presentes entre las cadenas de xiloglucano y dichas microfibrillas.

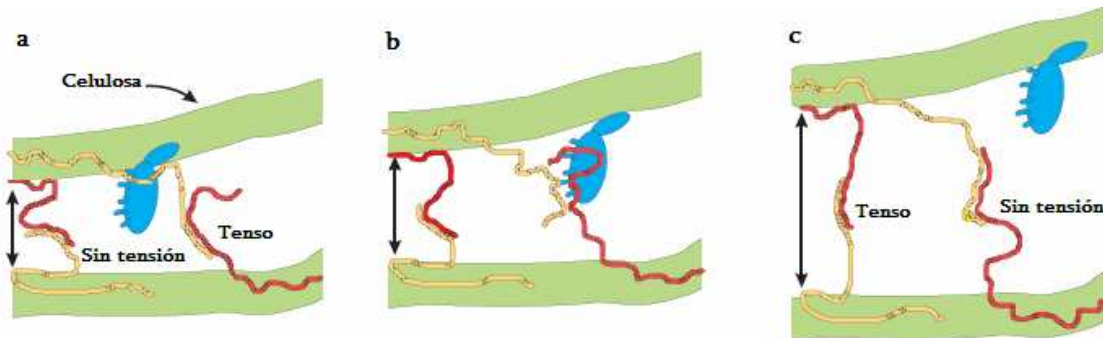


Figura I.9. Modo de actuación de las expansinas. (a) pueden separar las hemicelulosas y compuestos de la superficie de la celulosa (b) separar unas hemicelulosas de otras (c) bajo tensión mecánica la acción de las expansinas da lugar a un desplazamiento de los polímeros de la pared.

### Enzimas que actúan sobre los oligosacáridos de xiloglucano

En la pared celular existen varias enzimas capaces de modificar el xiloglucano y/o sus oligosacáridos (Fry, 1995). Estas exoglicosidasas, son capaces de degradar los oligosacáridos de xiloglucano hasta sus monómeros correspondientes, debido a que estos no se

incorporarían al interior celular (Baydoun y Fry, 1989). Estas exoglicosidasas presentan una actividad relacionada con cada uno de los residuos monoméricos que liberan, de esta forma tendríamos,  $\alpha$ -fucosidasas,  $\beta$ -galactosidasas,  $\alpha$ -xilosidasas y  $\beta$ -glucosidasas (Fig. I.10).

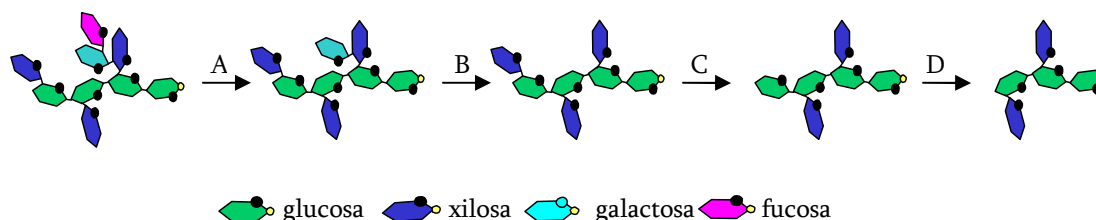


Figura I.10. Actividad secuencial de las distintas glicosil hidrolasas sobre el oligosacárido XXFG, A:  $\alpha$ -fucosidasa, B:  $\beta$ -galactosidasa, C:  $\alpha$ -xilosidasa, D:  $\beta$ -glucosidasa

La primera  $\alpha$ -fucosidasa se purificó en plantas de guisante (Farkas y col., 1991) y es activa frente al oligosacárido XXFG (Augur y col., 1993). También se purificó una  $\alpha$ -fucosidasa de repollo con actividad tanto frente a oligosacáridos como frente al xiloglucano polimérico. En *Arabidopsis thaliana* se clonó el gen correspondiente (*AtFXGI*) (de la Torre y col., 2002), que hidroliza oligosacáridos fucosilados.

Existen numerosos datos sobre la actividad  $\beta$ -galactosidasa en extractos de plantas. Algunas  $\beta$ -galactosidasas de plantas parecen ser activas frente al xiloglucano. Se supone que estarían

implicadas en la eliminación de residuos  $\beta$ -galactosil no sustituidos, presentes en los oligosacáridos o en la propia molécula de xiloglucano. Dicha actividad rompería los enlaces  $\alpha(1-2)$  presentes entre los restos  $\beta$ -galactosil y  $\alpha$ -xilosil. Esta enzima intervendría en la degradación de oligosacáridos como XLFG. Este es uno de los oligosacáridos más frecuentes, producto de la degradación mediante endoglucanasas de las cadenas de xiloglucano. En los cotiledones de *Tropaeolum majus*, se identificó una actividad  $\beta$ -galactosidasa capaz de actuar sobre los residuos

de galactosa del xiloglucano (Edwards y col., 1988).

En epicótilos de guisante se purificó una  $\alpha$ -xilosidasa activa frente a oligosacáridos de xiloglucano (O'Neill y col., 1989), que elimina restos de xilosa unidos al resto de glucosa más alejado del extremo no reductor. También se purificó otra  $\alpha$ -xilosidasa en *Tropaeolum majus* (Fanutti y col., 1991) y más recientemente en *Brassica oleacea* (Sampedro y col., 2001). A nivel génico, el gen *AtXYL1*, de *Arabidopsis thaliana*, codifica la proteína AtXYL1 con actividad  $\alpha$ -xilosidasa (Sampedro y col., 2001), y en *Pinus pinaster* el gen *PpXYL1* codifica la proteína PpXYL1 con actividad  $\alpha$ -xilosidasa (Sanchez y col., 2003).

Finalmente, se aisló a partir de cotiledones de *Tropaeolum majus*, una  $\beta$ -glucosidasa perteneciente a la familia 3 de las glicosil hidrolasas (GH3), con actividad frente a oligosacáridos de xiloglucano que presentan una glucosa no sustituida en su extremo no reductor (Crombie y col., 1998). Cuando la glucosa contigua lleva unida una galactosa, esta enzima no puede actuar, por lo tanto es activa frente al oligosacárido XXXG pero no frente a GLXG. Esto lleva a pensar que primero actuarían el resto de las exoglicosidasas eliminando la ramificación del extremo no reductor para que posteriormente actuaran las glucosidasas sobre los restos de  $\beta$ -glucosa.

La actuación de estas enzimas, puede ser muy importante en la regulación del control del crecimiento de la pared celular, dado que pueden modificar la cantidad y tipo de oligosacáridos presentes en el apoplasto, que es determinante en la expansión de la pared. La  $\alpha$ -xilosidasa, por ejemplo, eliminando el resto de xilosa más alejado del extremo reductor de la molécula de xiloglucano podría hacerla incapaz de actuar como aceptor de la XTH. La molécula de xiloglucano o el oligosacárido, podrían ser activados posteriormente como blanco de la XTH mediante la actividad  $\beta$ -D-glucosidasa. La inactivación-activación secuencial de las cadenas de xiloglucano por parte de la  $\alpha$ -D-xilosidasa y la  $\beta$ -D-glucosidasa puede ser bloqueada por una cadena lateral F o L. Para eliminar este bloqueo se necesita la actividad de las otras dos enzimas  $\alpha$ -L-fucosidasa y  $\beta$ -D-galactosidasa. Podría existir en la planta un mecanismo que regulase todas estas actividades exoglicosidasas, de forma que la planta pudiese modular la capacidad de las moléculas de xiloglucano como aceptoras de la XTH (Fry, 1995).

### **Oligosacáridos de xiloglucano: Control del crecimiento celular**

La degradación del xiloglucano ha sido estudiada en detalle en semillas de *Tropaeolum majus* (capuchina), donde constituye el principal polisacárido de reserva. Presenta una

estructura similar al xiloglucano de las paredes primarias de tejido vegetativo con la particularidad de que no está fucosilado. Durante la germinación tiene lugar la movilización del xiloglucano, y se pudo comprobar que ésta ocurre en dos pasos. En primer lugar se hidroliza en fragmentos grandes, por una xiloglucano endotransglicosilasa (XTH) con actividad hidrolítica, que rompe enlaces internos en los que participa el C1 de restos de glucosa no sustituidos, de modo que se generan nuevos extremos reductores. Esta enzima es altamente específica para el xiloglucano, siendo inactiva frente a otros sustratos, tales como la celulosa abundante en la pared. Además combina la actividad endotransglicosilasa con la actividad glucanasa, y es similar a la enzima XTH que actúa en tejidos vegetativos (Fanutti y col., 1993).

El segundo paso de la degradación del xiloglucano como vimos anteriormente consiste en la hidrólisis total para dar lugar a monosacáridos, y requiere la actividad de tres enzimas hidrolíticas la  $\beta$ -galactosidasa, la  $\alpha$ -xilosidasa y la  $\beta$ -glucosidasa.

La presencia de oligosacáridos de xiloglucano en el apoplasto, se debe principalmente a la degradación de las cadenas de xiloglucano polimérico por parte de las endoglucanasas presentes en la pared. Los oligosacáridos obtenidos presentan distinta

estructura y grado de polimerización (Hayashi y Maclachlan, 1984), ya que sobre ellos actúan las exoglucanasas. Algunos de estos monosacáridos pueden estimular el crecimiento de la pared, siempre que estén presentes en la concentración adecuada. En este proceso, podrían intervenir las XTHs, que los utilizarían como aceptores de la transglicosilación (Lorences y Fry, 1993). Estos oligosacáridos pueden competir con las cadenas de xiloglucano preexistentes o recién sintetizadas, permitiendo una mayor separación de las microfibrillas de celulosa, con el consiguiente debilitamiento de la pared, sin llegar a desestructurarse, pero permitiendo que actúe sobre ella la presión de turgencia. Por otro lado la separación de las microfibrillas de celulosa produciría una mayor tensión en las cadenas de xiloglucano, propiciando la actuación de las expansinas.

Como hemos visto con anterioridad, el xiloglucano presenta enlaces sobre los que puede actuar la endo- $\beta$ -(1-4)-glucanasa, para dar lugar a oligosacáridos como XXFG, XXXG (Hayashi y col., 1984), XLXG, XXLG (Guillen y col., 1995), que podrían tener un papel importante como reguladores del crecimiento. Se ha comprobado que el oligosacárido XXFG, a una concentración 1nM, actúa como inhibidor del efecto de la auxina 2,4-D, que estimula el crecimiento en condiciones normales (York y col., 1984). Además, este oligosacárido inhibe también el estímulo de crecimiento producido

mediante incubación en medio ácido (Lorences y col., 1990), o en ácido giberélico (Warneck y Seitz, 1993). Esta capacidad inhibitoria parece estar relacionada con los restos de fucosa, ya que se produce con oligosacáridos de fucosa, pero no con otros carentes de la misma. Además, en concentraciones mayores (1 $\mu$ M), el XXFG no sólo deja de inhibir el crecimiento en respuesta a auxinas, sino que lo favorece.

### **Clasificación de las glicosil hidrolasas**

Las glicosil hidrolasas (GH) y glicosil transferasas (GT) son enzimas que actúan sobre carbohidratos (Carbohydrate Active enZymes, CAZy) y que se clasifican en base a la similitud en su secuencia aminoacídica (Henrissat, 1991; Henrissat y Bairoch, 1993; Davies y Henrissat, 1995; Henrissat y Bairoch, 1996; Campbell y col., 1997; Henrissat y Davies, 1997; Coutinho y Henrissat, 1999). Hasta octubre 2007 se han descrito 110 familias de glicosil hidrolasas y 90 familias de glicosil transferasas.

La clasificación de las familias basada en la similitud de la secuencia aminoacídica fue extremadamente útil para la caracterización tridimensional de las enzimas incluidas en cada familia (Henrissat y Davies, 1997), ya que se comprobó con posterioridad, que dentro de una familia determinada, la estructura tridimensional (3D) se conserva. Como resultado del análisis funcional de las enzimas, se observó que la especificidad de sustrato viene

determinada por mínimas variaciones estructurales (Davies y Henrissat, 1995). Debido a que la estructura en sí, viene determinada por la secuencia, la estereoquímica y el resultado de la reacción se conserva dentro de cualquier familia de glicosil hidrolasas. No se encontró hasta el momento, ninguna excepción a esta afirmación, desde que fue propuesta por Withers y colaboradores (Gebler y col., 1992).

Una de las características más importantes de la clasificación es que, pese a la similitud de la secuencias, algunas familias son poliespecíficas, contienen enzimas con diferente especificidad de sustrato o producto, lo que es indicativo de una divergencia evolutiva que propició la adquisición de nuevas funciones. Por ejemplo, las celulasas, aparecen en las familias GH5-GH9, GH12, GH26, GH44, GH45, GH48 y GH61, con lo cual las estructuras 3D que presentan son muy variadas, por pertenecer a familias distintas. De las 110 familias de glicosil hidrolasas, se conocen las estructuras 3D de muchas de ellas.

Las glicosil hidrolasas son las mejor caracterizadas de todas las enzimas que actúan sobre carbohidratos. Llevan a cabo la hidrólisis ácido-base de los enlaces glucosídicos que pueden conducir a la inversión o retención de la configuración anomérica, dependiendo de la familia de enzimas. Numerosas revisiones de su estructura, función y mecanismos catalíticos, están disponibles (Sinnott, 1990; McCarter y

Withers, 1994; Davies y Henrissat, 1995; Zechel y Withers, 2000). Las reacciones de inversión emplean un solo mecanismo clásico de dislocación, mientras que la retención se lleva a cabo por una vía doble que implica la formación e hidrólisis consecuente de un intermediario covalente. Una característica importante del mecanismo de retención, de importante relevancia para la bioquímica de la planta es que el intermediario de reacción, puede ser interceptado por nucleófilos en un proceso denominado transglicosilación. En plantas, esta reacción puede desempeñar un importante papel, como ocurre con las xiloglucanoendotransferasas que se relacionan con la familia GH16. *Arabidopsis* contiene un total de más de 730 glicosil hidrolasas y glicosil transferasas, que son muchas más de las que contienen ningún otro eucariota estudiado hasta el momento.

Las enzimas incluidas en estas familias desempeñan muy diversas funciones, por ejemplo, las plantas usan como material de reserva el almidón, una macromolécula compleja que se sintetiza por acción de enzimas

biosintéticas (sintasas y fosforilasas), y transglicosilasas responsables de la hidrólisis y creación de puntos de ramificación. La hidrólisis del almidón es realizada por  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasas y  $\beta$ -glucosidasas. En *Arabidopsis*, la maquinaria completa para la síntesis y degradación del almidón se encuentra entre las familias GT5, GT35, GH13, GH14, GH31 y GH77. La familia GH17, en cambio, está relacionada con mecanismos de defensa, en concreto con la respuesta patógeno-huésped. Enzimas hidrolíticas,  $\beta$ -glucosidasas, tales como la mirosinasa, se encuentran en la familia GH1. Otro ejemplo, serían las enzimas que llevan a cabo la glicosilación con función de defensa, que están mayoritariamente en la familia GT1. Estas glicosil transferasas reconocen el nucleótido correspondiente y el aceptor adecuado. La multiplicidad de enzimas en GT1 refleja la gran variedad de aceptores específicos. El número de enzimas incluidas en las diferentes familias se ha ido incrementando a lo largo del tiempo y probablemente continuará aumentando.



## Objetivos

El objetivo general de este trabajo es el estudio y caracterización de las  $\beta$ -glucosidasas y  $\beta$ -galactosidasas apoplásticas de *Arabidopsis thaliana*. Ambos tipos de enzimas están implicadas en el metabolismo del xiloglucano, de forma que pueden jugar un papel importante en el crecimiento celular y por lo tanto en el desarrollo de la planta. Los principales objetivos de este trabajo se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. Caracterización de las  $\beta$ -glucosidasas, pertenecientes a la familia 3 de las glicosil hidrolasas, y  $\beta$ -galactosidasas, pertenecientes a la familia 35 de las glicosil hidrolasas, de *Arabidopsis thaliana* que puedan estar implicadas en el metabolismo del xiloglucano y/o de sus oligosacáridos.

2. Análisis de expresión de las posibles  $\beta$ -glucosidasas y  $\beta$ -galactosidasas objeto de estudio, en diferentes regiones de la planta y en diferentes estados de desarrollo.

3. Estudio de ambas actividades exoglicosidasas en el apoplasto de *Arabidopsis thaliana* y sobre oligosacáridos de xiloglucano, así como los posibles efectos fenotípicos de la ausencia de dichas actividades.

4. Caracterización estructural de diferentes mutantes *knockout* de las  $\beta$ -glucosidasas y  $\beta$ -galactosidasas de interés.

5. Análisis de la actividad de diferentes mutantes seleccionados, tanto de  $\beta$ -glucosidasas como de  $\beta$ -galactosidasas, frente a diferentes oligosacáridos de xiloglucano.

Los puntos anteriores serán ampliamente desarrollados a lo largo de este trabajo a fin de caracterizar en detalle ambas actividades y determinar su papel en el metabolismo del xiloglucano.

*Capítulo II:  $\beta$ -glucosidasas de  
Arabidopsis thaliana*



## II.1. Introducción

Es indiscutible la importancia del xiloglucano, ya que es el principal polisacárido hemicelulósico de la pared celular primaria de plantas de tipo I, como *Arabidopsis thaliana* (Hayashi, 1989; Fry, 1989; Zablackis y col., 1995). Por un lado, es fundamental para el mantenimiento de la arquitectura de la pared (Cosgrove, 2001), y por otro, es blanco de enzimas implicadas en la extensión de la pared celular. Mediante la rotura y reestructuración de sus cadenas permite la separación de las microfibrillas de celulosa al mismo tiempo que mantiene la estructura de la pared. El xiloglucano es un polímero constituido por una cadena lineal de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucano, en la que la mayoría de los residuos de glucosa están sustituidos con una  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-xilosa que a su vez puede estar sustituida con residuos de galactosa, que pueden llevar unido o no un resto de fucosa.

Las cadenas de xiloglucano se unen a las microfibrillas de celulosa de la pared celular, mediante puentes de hidrógeno, para dar lugar a la red XyG-Celulosa (Bauer y col., 1973; Hayashi y MacLachlan, 1984). La naturaleza dinámica de esta red es el factor más importante que controla el grado de extensión de la pared. Las moléculas de xiloglucano, por acción específica de endo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glucanasas

o xiloglucano endotransglucosilasas (Edwards y col., 1986; Farkas y col., 1992; Fanutti y col., 1993; De Silva y col., 1993; Fanutti y col., 1996; Chanliaud y col., 2004), pueden liberar oligosacáridos de xiloglucano, algunos de los cuales tienen capacidad para modular el crecimiento de la planta (Creelman y Mullet, 1997). La formación de dichos oligos *in vivo*, por hidrólisis del XyG preexistente, fue observada en cultivos de células en suspensión (Fry, 1986; Baydoun y Fry, 1989; McDougall y Fry, 1991).

Hay varias exoglicosidasas capaces de actuar sobre el xiloglucano y/o sus oligosacáridos en las paredes celulares de plantas (Fry, 1995) que son capaces de degradarlos hasta sus monómeros correspondientes. Estas glicosidasas son las  $\alpha$ -fucosidasas,  $\beta$ -galactosidasas,  $\alpha$ -xilosidasas y  $\beta$ -glucosidasas. Estas glicosidasas actuando sobre los oligosacáridos del xiloglucano (XXFG, XLFG, XXXG, etc) por el orden mencionado con anterioridad darán lugar a la degradación de los mismos. En este capítulo estudiaremos las  $\beta$ -glucosidasas y su acción eliminando la glucosa no sustituida del extremo no reductor de los oligosacáridos del xiloglucano.

A partir de los cotiledones de *Tropaeolum majus* L. se purificó una  $\beta$ -glucosidasa capaz de hidrolizar *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido, disacáridos de glucosa y ciertos oligosacáridos

de xiloglucano. Esta  $\beta$ -glucosidasa actúa frente a oligos que presentan una glucosa no sustituida en su extremo no reductor (Crombie y col., 1998), como GXXG, GXLG. Sin embargo, cuando la glucosa contigua lleva unido un resto de galactosa, esta enzima no puede actuar, por lo tanto no es activa frente a oligosacáridos tales como GLXG o GLLG. Esto lleva a pensar que primero actuarían el resto de exoglicosidasas, que eliminarían la ramificación del extremo no reductor, para permitir la actividad de las glucosidasas, que eliminarían finalmente el residuo de  $\beta$ -glucosa. En el caso de la  $\beta$ -glucosidasa de *Tropaeolum*, se obtuvo un DNA completo de 1962 bp, que codifica un polipéptido de 654 aminoácidos, incluyendo el extremo N-terminal y una región de señal hacia el apoplasto, el número de acceso de dicha proteína es EC 3.2.1.21. Además, las búsquedas en la base de datos revelaron que presentaba homología con otras glucosidasas de bacterias, plantas y levaduras. El estudio de la secuencia, permitió incluirla dentro de la familia 3 de las glicosil hidrolasas (GH3) de acuerdo con la clasificación de Henrissat (Henrissat, 1991).

En función de la similitud con la  $\beta$ -glucosidasa de *Tropaeolum majus*, que ha sido clonada y cuya actividad frente a oligosacáridos de xiloglucano ha sido demostrada, hemos realizado una búsqueda de posibles  $\beta$ -

glucosidasas en *Arabidopsis thaliana*, con el objeto de identificar cuál o cuáles de ellas podrían participar en la degradación del xiloglucano. De estas, se han seleccionado las cuatro de mayor similitud a la identificada por Crombie y col. que son las codificadas por los genes *At5g20950*, *At5g20940*, *At5g04885* y *At3g62710* que a partir de ahora pasamos a denominar *AtBGLC1*, *AtBGLC2*, *AtBGLC3* y *AtBGLC4* respectivamente.

En este capítulo, estudiaremos las posibles variaciones en la expresión de dichas glucosidasas en diferentes órganos de la planta y en diferentes estados de desarrollo. Para comprobar si su expresión es mayor en zonas en crecimiento activo, lo que sería indicativo de su implicación en el crecimiento de la pared. Además se caracterizará la acción *in vivo*, en el fluido apoplástico de *Arabidopsis thaliana*, de las glucosidasas utilizando como sustrato específico XXXG y analizando los productos de degradación mediante MALDI-TOF MS. Se estudiarán además mutantes *knockout* de *Arabidopsis* para los cuatro genes citados, mediante la degradación de sus paredes con una endo- $\beta$ -(1-4)-glucanasa y el análisis de los oligosacáridos producto de la degradación.

## II.2. Materiales y Métodos

### II.2.1. Material vegetal

Plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh ecotipo Columbia 0, se crecieron en cámara a 25°C con un fotoperíodo de 16:8 luz/oscuridad, en sustrato de tierra vegetal: vermiculita (3:1). Se utilizó el sistema de crecimiento ARASYSTEM (www.arasystem.com).

También se utilizaron mutantes *knockout* correspondientes a las posibles glucosidasas apoplásticas de interés, obtenidos de diferentes colecciones públicas. El mutante correspondiente al gen *AtBGLC1* fue obtenido del centro de recursos biológicos RARGE (RIKEN Arabidopsis + Genome Encyclopedia, <http://rarge.psc.riken.jp/>). Fue construido mediante inserción de un transposón DS en *Arabidopsis thaliana* ecotipo Nössen (Fedoroff y Smith, 1993), el sitio de inserción del transposón fue determinado por homología (BLASTN) con el ecotipo Columbia. La línea mutada correspondiente, tiene el código RIKEN 52-0513-1, este mutante se selecciona en base a su resistencia a higromicina (figura II.1).

Los mutantes correspondientes a los locus *AtBGLC2* y *AtBGLC3* se obtuvieron de Syngenta Arabidopsis Insertion Library (SAIL), y actualmente están disponibles en Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC), (<http://www.arabidopsis.org/abrc/>). La información de las secuencias está disponible en GenBank y en el Salk Institute (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>).

Dichas líneas se obtuvieron por inserción, de un fragmento de T-DNA en plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia, utilizando vectores de *Agrobacterium tumefaciens* (figura II.2) (Sessions y col., 2002). Los mutantes seleccionados fueron SAIL\_889\_G06 (Cód. CS840053) para *AtBGLC2* y SAIL\_13\_H10 (Cód. CS800645) para *AtBGLC3*, obtenidos utilizando los vectores pDAP101 y pCSA110, respectivamente. Estos mutantes se seleccionaron en base a su resistencia al herbicida BASTA.

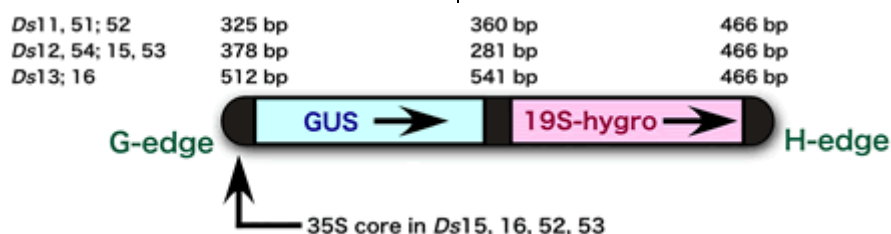


Figura II.1. Estructura del transposón Ds empleado para la obtención del mutante de inserción del gen *AtBGLC1*, contiene el gen de resistencia a higromicina y el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS).

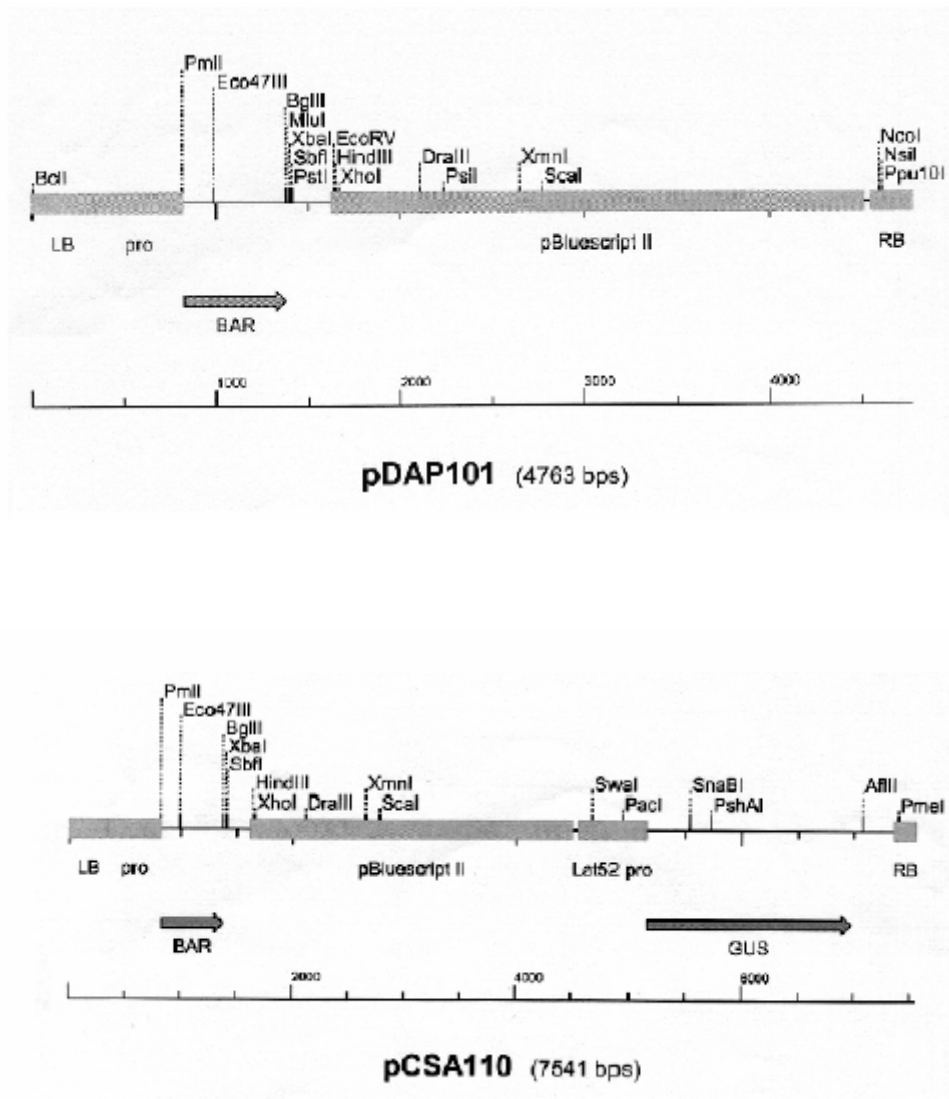


Figura II.2. Vectores pDAP101 (*AtBGLC2*), que contiene el gen BAR de resistencia a BASTA, y el vector pCSA110 (*AtBGLC3*), que además de contener el gen BAR, contiene el gen GUS, que permite controlar la localización del inserto así como sus niveles de expresión, precedido de un promotor (lat52 pro) que activa o inactiva dicho gen.

En el caso del gen *AtBGLC4*, el mutante se obtuvo de la colección de Exotic Trapping Insert Collection (EXOTIC, <http://www.jic.ac.uk/science/cdb/exotic/index.htm>) mediante inserción de un único transposón en el gen correspondiente en *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia y

presenta también resistencia a BASTA (tabla II.1). El mutante del gen *AtBGLC4* seleccionado fue el SM\_3\_29008 (Cod. CS116040).

Locus	Gen	Colección	Código	Ecotipo	Resistencia
AtBGLC1	<i>AtBGLC1</i>	RIKEN BRC	52-0513-1	Nössen	Higromicina
AtBGLC2	<i>AtBGLC2</i>	SAIL	SAIL_889_G06	Columbia	BASTA
AtBGLC3	<i>AtBGLC3</i>	SAIL	SAIL_13_H10	Columbia	BASTA
AtBGLC4	<i>AtBGLC4</i>	JIC	SM_3_29008	Columbia	BASTA

Tabla II.1. Mutantes *knockout* utilizados correspondientes a cada una de las  $\beta$ -glucosidasas objeto de estudio.

### II.2.2. Análisis filogenético

El árbol filogenético de las  $\beta$ -glucosidasas más próximas a la  $\beta$ -glucosidasa de *Tropaeolum majus* pertenecientes a la familia 3 de las glicosil hidrolasas, se realizó a partir de alineamientos obtenidos con ClustalW (Thompson y col., 1994) utilizando el método Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) con el programa Mega 3 (Kumar y Kumar, 2001). Para la predicción del destino celular de las glucosidasas objeto de estudio se utilizó el programa PSORT (Nakai y Kanehisa, 1992). La búsqueda de secuencias homólogas se llevó a

cabo con el paquete de programas NCBI BLAST 2.0 (Altschul y col., 1997). Los alineamientos de secuencias nucleotídicas, se obtuvieron con el programa MULTALIN (Corpet, 1988).

### II.2.3. Extracción del RNA total

Para la extracción del RNA total, partimos de hojas maduras (primer par de hojas de la roseta basal) y de hojas jóvenes (cuarto par de hojas de la roseta basal) de 21 días, y de silicuas, segmentos del tallo y ápice floral de plantas de aproximadamente 30 días (figura II.3).



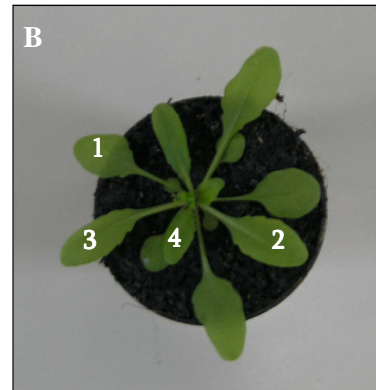
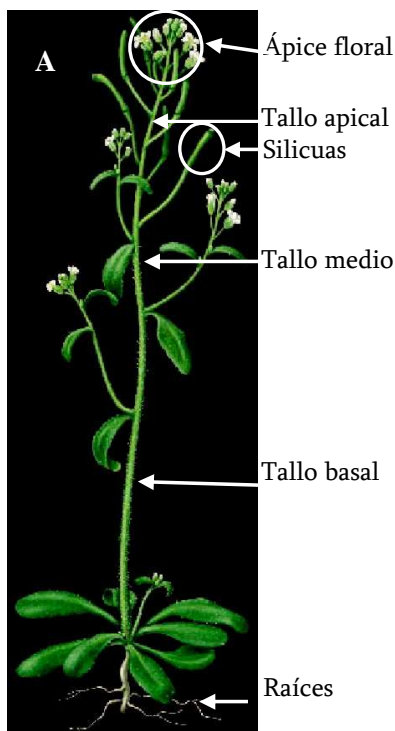


Figura II.3

A. Roseta basal de *Arabidopsis thaliana* de 20/21 días de edad, las hojas del primer par son las que denominamos hojas maduras y las del cuarto par las hojas jóvenes.

B. Aparecen indicadas el resto de regiones de la planta empleadas para la extracción de RNA, en este caso plantas de 30 días de edad de unos 10-12 cm.

Se pesaron entre 50 y 100 mg de material, que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Se homogenizaron con un micropistilo, y se extrajo el RNA empleando el RNeasy Plant Mini Kit ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)). El RNA se cuantificó por absorbancia a 260 nm.

#### II.2.4. Síntesis de cDNA

El RNA se trató con el Kit RQ1 RNase-Free DNase de Promega, para evitar una posible contaminación con DNA que pudiese interferir en la amplificación posterior. El cDNA se obtuvo utilizando el 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) ([www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)) siguiendo las

instrucciones del fabricante y partiendo de 1  $\mu$ g del RNA total.

#### II.2.5. PCR semi-cuantitativa en Tiempo Real

La PCR semi-cuantitativa en tiempo real es una técnica de gran sensibilidad y especificidad para la detección de DNA, y permite determinar los niveles de expresión, al comparar un gen objeto de estudio con otro gen de expresión constante durante cualquier estadio de desarrollo. En el caso de *Arabidopsis*, consideramos el gen de la  $\beta$ -tubulina (*At5g23860*) como de expresión constitutiva.

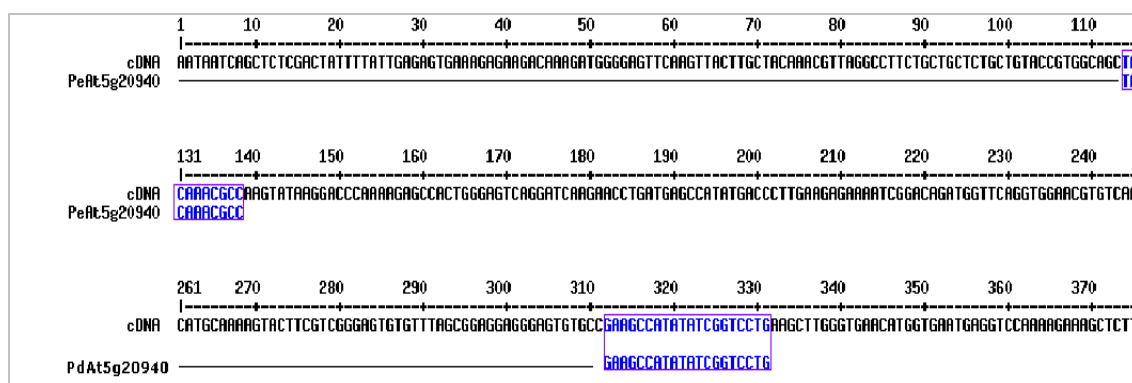


Figura II.4. Diseño de cebadores utilizados para la PCR en tiempo real de la  $\beta$ -glucosidasa AtBGLC2, con una longitud de entre 120 y 200 pb. Para las demás glucosidasas se siguió el mismo procedimiento.

Para llevar a cabo dicha PCR, se utilizaron cebadores diseñados sobre cDNA (figura II.4), para amplificar un fragmento de unas 150-220 pb. Las condiciones de la PCR fueron las

recomendadas por el fabricante de la polimerasa con SYBR® green (www.appliedbiosystems.com).

Nombre Locus	Secuencia de nucleótidos
AtBGLC1-1	5'- GCTGCTGAGGGTACTTTGAA -3'
AtBGLC1-2	5'- CAGGAGTAGCTTTTTCCGAG -3'
AtBGLC2-1	5- CGTAATAAAGTACCACTCGCAAACGCC -3'
AtBGLC2-2	5'- CAGGACCGATATATGGCTTC -3'
AtBGLC3-1	5'- GGA CTACACTTCTTAGCGCTGTAAAATCAG -3'
AtBGLC3-2	5'- ACTTGACAGCCTGACAAGTGAGCTA -3'
AtBGLC4-1	5'-CAATGTTTCGGCGTCAGGAGCTT-3'
AtBGLC4-2	5'-CCACCGGTAACCTTGTGAGAAGTTGAAC-3'
Tubulina_At5g23860_E	5'-CGTGGATCACAGCAATACAGAGCCGTACGGTCATCATCTGACAC-3'
Tubulina_At5g23860_D	5'-CCTCCTGCACTTCCACTTCGTCTTCGCGTGAGTATTACGAAGGTG-3'

Tabla II.2. Cebadores utilizados para la amplificación de las regiones genómicas de las  $\beta$ -glucosidasas en estudio.

## II.2.6. Obtención del extracto apoplástico

Para la obtención de extracto apoplástico se siguió el método de Monroe y col. (Monroe y

col., 1999), adaptado para *Arabidopsis* por Sampedro y col. (Sampedro y col., 2001). Se utilizaron 200 mg de semillas que se esterilizaron con NaClO al 1% durante 10 min. Se depositaron en matraces de 100 ml conteniendo 20 ml de agua MilliQ estéril y 50 mg de semillas cada uno. Se mantuvieron en oscuridad a 4°C durante 3 días. Posteriormente se crecieron en cámara, a 25°C, con agitación orbital (120 rpm) y luz continua. Las plántulas crecidas en agua se pasaron a tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7,2 con NaCl 1 M y se mantuvieron en agitación durante 6 horas en las mismas condiciones. Al cabo de ese tiempo se filtraron a través de muselina y se consideró el filtrado como extracto apoplástico. En estas condiciones, la fracción apoplástica se ve libre de contaminación citoplásmica (Sampedro y col., 2001).

El extracto apoplástico se dializó en Amicon Stirred Cell 8010 (www.millipore.com) con una membrana YM10 (www.millipore.com) frente a tampón ácido acético: piridina: agua, en relación 1:1:98 (v/v/v) y pH 4,5, hasta 3 ml. Posteriormente se concentró en Amicón Centricón YM-10 (www.millipore.com) hasta obtener un volumen final de 200  $\mu$ l.

#### II.2.7. Preparación de XXXG

El sustrato XXXG se obtuvo por digestión de xiloglucano de *Tamarindus indica*, tratado

con endoglucanasa de *Trichoderma viride* (EC 3.2.1.4, Sigma España). Los oligosacáridos producidos fueron separados mediante cromatografía en una columna Bio-Gel P-2 (Bio-rad.com) de 41 x 3 cm y eluidos con acético-piridina 50 mM, pH 4,7. Las diferentes fracciones fueron secadas a vacío en Speed-Vac (Savant Instruments, USA).

#### II.2.8. Actividad apoplástica frente a XXXG.

Para medir la actividad  $\beta$ -glucosidasa frente a oligosacáridos de xiloglucano, se utilizaron 20  $\mu$ l de extracto apoplástico con pH 4,5 y se añadieron 10  $\mu$ l de oligosacárido XXXG (1 $\mu$ g/ $\mu$ l). La reacción se llevó a cabo a 30°C, durante 0, 4, 8 y 14 horas (Iglesias y col., 2006). Tras la incubación se separó una alícuota de 2  $\mu$ l que se utilizó para el análisis de oligosacáridos mediante MALDI-TOF. Mediante esta técnica se analizó también la composición de oligosacáridos, de paredes celulares de los distintos mutantes *knockout*, correspondientes a las cuatro  $\beta$ -glucosidasas en estudio, a partir de una alícuota de 2  $\mu$ l del medio de reacción correspondiente obtenido tras el tratamiento con endocelulasa, mezclado con el mismo volumen de matriz DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzoico), y cargando, también, 1  $\mu$ l en placa (figura II.5).

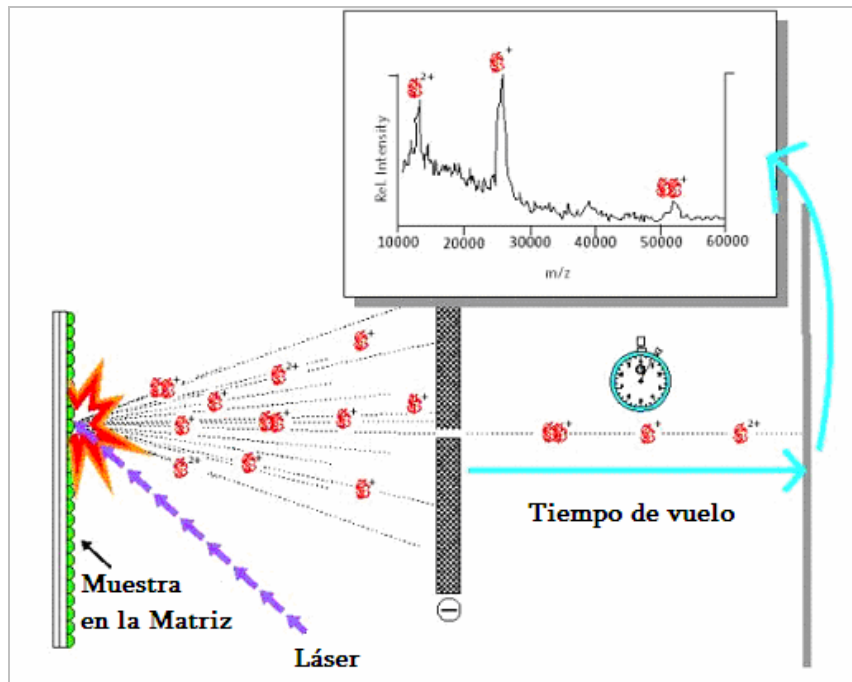


Figura II.5. Espectrometría de masas MALDI-TOF: En la ionización MALDI (Matriz-Assisted Laser Desorption/Ionization) los analitos cristalizados con la matriz adecuada son convertidos en iones mediante la acción de un láser. Esta ionización suele asociarse a un analizador de tiempo de vuelo (TOF: Time of Flight), en el que los iones se separan en función de su relación masa/carga tras ser acelerados en un campo eléctrico. La matriz dificulta las interacciones analito-analito y actúa como intermediaria en el proceso de transferencia de energía del haz de luz láser a los analitos. En el proceso de conversión de las moléculas neutras de analito a especies cargadas o iones, la matriz juega un papel fundamental al ceder protones a los analitos.

### II.2.9. Siembra de mutantes

La siembra del mutante resistente a higromicina se realizó en placas de medio MS para *Arabidopsis*, agar al 1% y suplementadas con el correspondiente antibiótico 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . En el caso de los mutantes resistentes a BASTA, se realizó la siembra directamente en el sustrato vegetal/vermiculita y se procedió al rociado con el herbicida cada 3 días durante un período de 10 días, comenzando con plantas de aproximadamente una semana.

Las plantas se crecieron en fitotrón con un fotoperíodo de 16:8 luz/oscuridad y una temperatura de 25°C.

### II.2.10. Análisis de paredes celulares de hojas

Se partió de un par de hojas de la roseta basal de plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo columbia 0 (silvestre) y de los diferentes mutantes *knockout* de las correspondientes glucosidasas, de 21 días. Se fijaron en 5 ml de metanol hirviendo durante 10-15 min, se lavaron con metanol:cloroformo (1:1, v/v) (x4) y se secaron en éter etílico. El residuo seco y

homogenizado, se consideró como pared celular. A continuación se resuspendió en 1 ml de tampón acético-piridina 10 mM a pH 7,2 y se incubó con 5  $\mu$ l de endocelulasa (EGII) (Megazyme International, Ireland, E.C. 3.2.1.4) durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se centrifugó para eliminar los residuos no digeridos y 400  $\mu$ l del sobrenadante se filtraron en Ultrafree MC de 0,45  $\mu$ m (Millipore) con Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech, [www4.gelifesciences.com](http://www4.gelifesciences.com)). Se secaron en el Speedvac y finalmente se resuspendieron en 10  $\mu$ l de agua. Los oligosacáridos de xiloglucano liberados se analizaron mediante MALDI-TOF como se indica en el apartado correspondiente.

#### II.2.11. Análisis de oligosacáridos de xiloglucano: MALDI-TOF MS

El análisis de las mezclas de oligosacáridos se llevó a cabo según el método descrito por Lerouxel (Lerouxel y col., 2002) y adaptado por nosotros (Iglesias y col 2006). Una alícuota (2

$\mu$ L) de la mezcla a analizar se mezcló con el mismo volumen de matriz DHB (10 mg de ácido 2,5-dihidroxibenzoico en 1 ml de acetonitrilo: agua, 7:3 (v/v)). De la mezcla se utilizó finalmente 1  $\mu$ l, que se depositó en la placa Bruker de MALDI-TOF y se secó a vacío. Finalmente se analizaron las muestras en un espectrómetro de masas, Bruker Autoflex MALDI-TOF ([www.bdal.com](http://www.bdal.com)) utilizando Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics) como referencia para calibrar.

#### II.2.12. Análisis de componentes principales

Para analizar los espectros de masas correspondientes a plantas individuales de los diferentes mutantes correspondientes a las cuatro  $\beta$ -glucosidasas, se empleó el programa Win-Das (Kemsley, 1998). Este programa, nos permitió comparar la composición del xiloglucano de paredes de los distintos mutantes *knockout* con Columbia 0, y poder seleccionar aquellos con un xiloglucano diferente al silvestre.

## II.3. Resultados y Discusión

### II.3.1. $\beta$ -glucosidasas de la familia 3 de las glicosil hidrolasas de *Arabidopsis thaliana*

Para iniciar la búsqueda de las posibles  $\beta$ -glucosidasas de *Arabidopsis thaliana* con actividad sobre el xiloglucano y/o sus oligosacáridos se realizó un árbol filogenético de la familia 3 de las glicosil hidrolasas a la que pertenece la descrita en *Tropaeolum majus*, que posee actividad demostrada sobre oligosacáridos de xiloglucano (Crombie y col., 1998) (figura II.6).

A partir del árbol obtenido, fueron seleccionadas las cuatro posibles  $\beta$ -glucosidasas más próximas a la descrita en *Tropaeolum*, que además presentan una alta probabilidad de dirigirse al apoplasto por la ruta vesicular. Para saber el destino más probable de dichas proteínas se utilizó el programa PSORT Prediction (Nakai y Kanehisa, 1992). Las  $\beta$ -glucosidasas seleccionadas son las codificadas por los genes *AtBGLC1*, *AtBGLC2*, *AtBGLC3* y *AtBGLC4*. De las restantes proteínas que aparecen en el árbol, At3g47050, At3g47010, At3g47000 y At3g47040 son posibles  $\beta$ -glucosidasas, mientras que At1g78060,

At5g10560, At3g19620, At1g02640, At5g49360, At5g09730 y At5g64570 son posibles  $\beta$ -xilosidasas.

Cuando se compararon las secuencias de la cuatro  $\beta$ -glucosidasas de *Arabidopsis* seleccionadas, se observó una homología entre ellas de aproximadamente un 73%, que es mayor en el caso de *AtBGLC1* y *AtBGLC2* ya que alcanzan un 82% de similitud. Los alineamientos múltiples se realizaron con el programa MultAlin (Corpet, 1988). De estas cuatro glucosidasas, el gen *AtBGLC4* se encuentra en el cromosoma 3 de los cinco que forman el genoma de *Arabidopsis*, mientras que las otras tres están codificadas por genes situados en el cromosoma 5. Las cuatro proteínas codificadas por los genes seleccionados presentan péptido señal, que las dirige al apoplasto ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)). Además *AtBGLC1*, presenta una posible región transmembrana. Las glucosidasas codificadas por los genes *AtBGLC1* y *AtBGLC2* están en tándem (figura II.7).

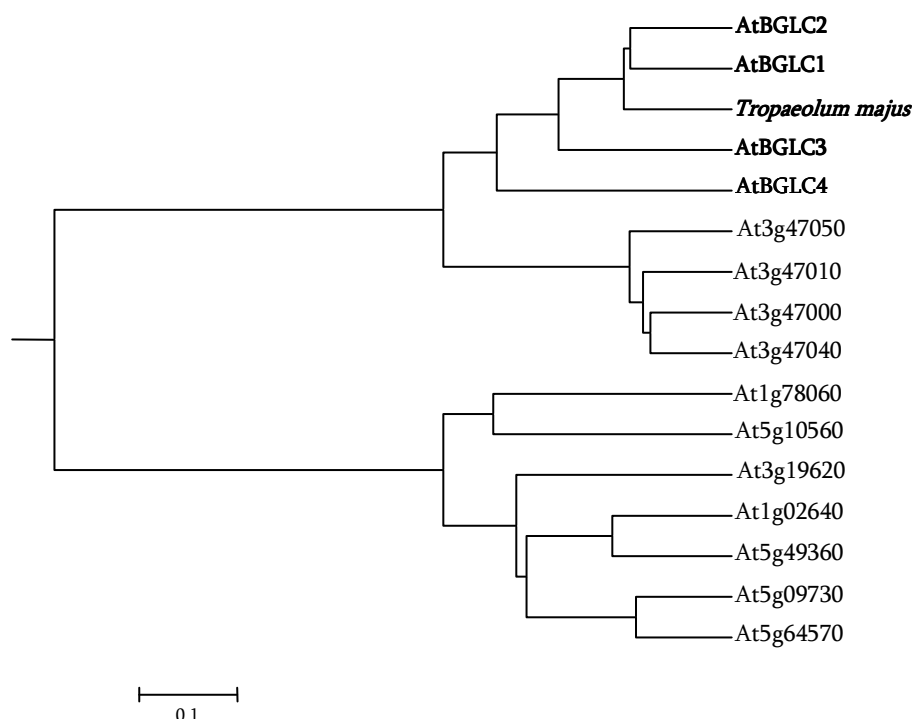


Figura II.6. Árbol filogenético de las posibles  $\beta$ -glucosidasas de *Arabidopsis* pertenecientes a la familia 3 de las glicosil hidrolasas, en negrita aparecen las de mayor similitud a la identificada en *Tropaeolum majus*. Se utilizó el programa informático Mega 3 con las secuencias de aminoácidos de las correspondientes proteínas.



Figura II.7. Región del cromosoma 5 de *Arabidopsis thaliana*, en la que aparecen los genes *AtBGLC1* y *AtBGLC2*, que están en tándem.

En la figura II.8 se muestra el alineamiento obtenido para las cuatro posibles  $\beta$ -glucosidasas, en rojo aparecen los aminoácidos idénticos. Además, en el caso de AtBGLC1 se

indica la localización del péptido señal, en el recuadro verde, y dónde se sitúa la región transmembrana que posee dicha proteína marcada con un recuadro azul.

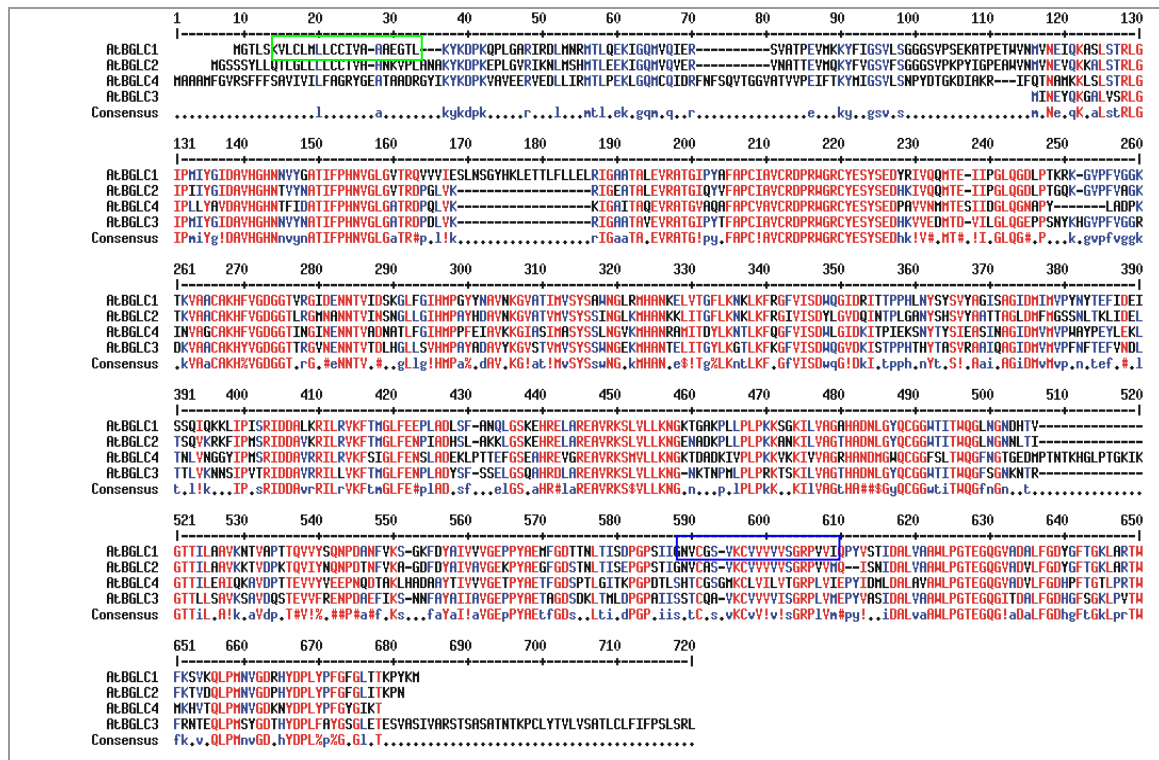


Figura II.8. Se muestran las secuencias alineadas de las cuatro posibles  $\beta$ -glucosidasas en estudio. Dichas secuencias fueron obtenidas del CAZY y el alineamiento fue realizado utilizando el programa Multalin. Aparece marcado en verde el péptido señal de la proteína AtBGLC1, mientras que en azul aparece marcada la región transmembrana que presenta dicha proteína.

### II.3.2. PCR semi-cuantitativa en tiempo real

Una vez seleccionadas las glucosidasas de *Arabidopsis thaliana* con mayor probabilidad de actuar sobre el xiloglucano, pasamos a estudiar los niveles de expresión de sus genes, *AtBGLC1*, *AtBGLC2*, *AtBGLC3* y *AtBGLC4*, en distintas partes de la planta, mediante PCR semi-cuantitativa en tiempo real. Se amplificó una región de cada uno de los genes de unas 200 pb, una vez diseñados los correspondientes cebadores sobre cDNA que fueron analizados mediante diferentes programas informáticos para comprobar que eran específicos para cada

glucosidasa, para evitar amplificaciones inespecíficas.

Se estudiaron los niveles de expresión de cada gen en raíces, ápice floral, silicuas, y en tallo y hojas. En el caso de hojas y tallo, se puede relacionar el nivel de expresión con el grado de desarrollo. En el caso del tallo, lo dividimos en apical (joven) y basal (maduro). En las hojas, diferenciamos entre primer par y cuarto par, ya que partiendo de plantas de 21 días, las hojas presentan un fuerte gradiente de crecimiento.

Los niveles de expresión relativos se cuantificaron en relación a la  $\beta$ -tubulina



(*At5g23860*), que es un gen de *Arabidopsis* de expresión constitutiva. Dicha cuantificación está basada en los valores Ct descritos por Pfaffl en 2001 (Pfaffl, 2001). La expresión de los genes objeto de estudio está normalizada con respecto a valor de expresión de cada uno de los genes en hoja madura. En la gráfica (figura II.9) se muestra la expresión de los cuatro genes que codifican las posibles  $\beta$ -glucosidasas de *Arabidopsis thaliana* más próximas a la de *Tropaeolum majus*, y se observa que presentan patrones diferentes.

La expresión del gen *AtBGLC1* presenta una correlación positiva con respecto al grado de desarrollo en hojas y tallo, mientras que la expresión en otras regiones de la planta es menor que la de hoja madura utilizada como control, es el caso de flores y silicuas, en cambio en raíces el nivel de expresión es superior al de hoja madura. El gen *AtBGLC2* también presenta una mayor expresión en zonas en crecimiento activo, hoja joven y tallo apical, con respecto a hoja madura y tallo basal,

aunque en este caso las diferencias son mayores que en el caso de *AtBGLC1*. En este caso el nivel de expresión en las restantes partes de la planta es igual (flores) o superior al de hoja madura (silicua y raíz). En cuanto al gen *AtBGLC3* ocurre lo mismo en tallo y hoja que para los genes anteriores, salvo que la diferencia de expresión es más notable en el caso del tallo. Por lo tanto, los tres genes anteriores, presentan una correlación positiva entre grado de desarrollo y expresión, lo cual sería indicativo de que los genes *AtBGLC1*, *AtBGLC2* y *AtBGLC3* podrían estar implicados en la extensión de la pared durante el desarrollo, ya que presentan mayor expresión en zonas de la planta en crecimiento activo. Sin embargo, en el caso de *AtBGLC4*, se expresa en un nivel similar en hojas jóvenes y maduras, pero su expresión es mayor en el tallo apical (en crecimiento activo) con respecto al tallo basal (maduro). Su nivel de expresión es similar en hoja joven, madura, tallo basal y silicua, el mayor nivel de expresión se observa en flores.

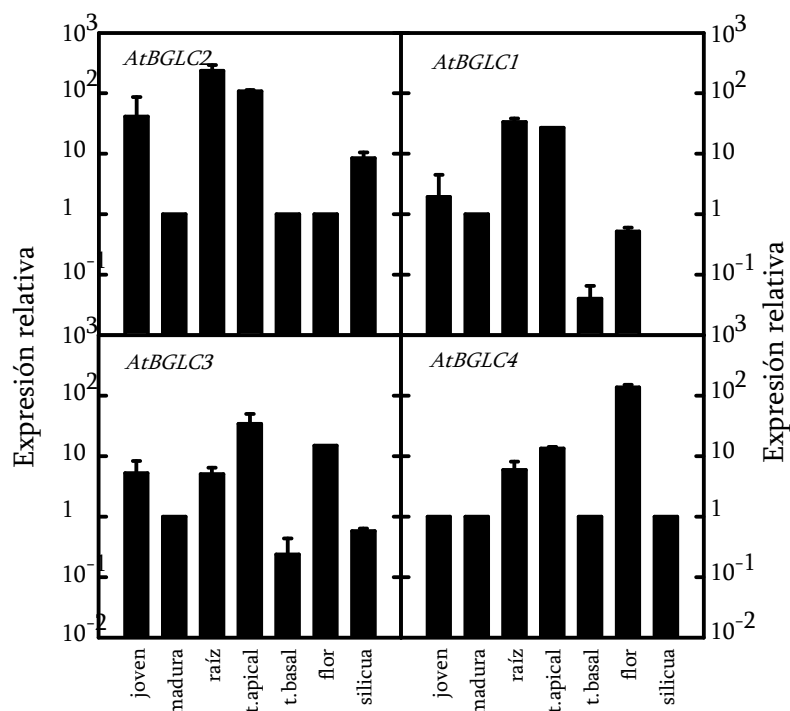


Figura II.9. Patrón de expresión de los genes que codifican las  $\beta$ -glucosidasas en diferentes regiones de la planta y en distintos estados de desarrollo. Hoja joven y hoja madura, raíz, tallo apical y tallo basal, flor y silicua.

### II.3.3. Actividad apoplástica frente a XXXG

Partiendo de apoplasto de *Arabidopsis thaliana* de plántulas y utilizando como sustrato el oligosacárido XXXG, se determinó la actividad  $\alpha$ -xilosidasa y  $\beta$ -glucosidasa, que lo

degradan de forma secuencial (figura II.10). Posteriormente se analizaron los productos de digestión mediante MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization).



Figura II.10. Actividad secuencial de la  $\alpha$ -xilosidasa y  $\beta$ -glucosidasa sobre el oligosacárido XXXG y GXXG respectivamente, para dar lugar al oligosacárido XXG, los oligosacáridos con relación m/z por debajo de 700 fueron excluidos, debido a la baja intensidad de la señal que complica su identificación.

La actividad *in vitro* de ambas enzimas se llevó a cabo a diferentes temperaturas, concluyendo que la actividad óptima de ambas se producía a 30°C, los resultados obtenidos a dicha temperatura aparecen representados en la figura II.11.

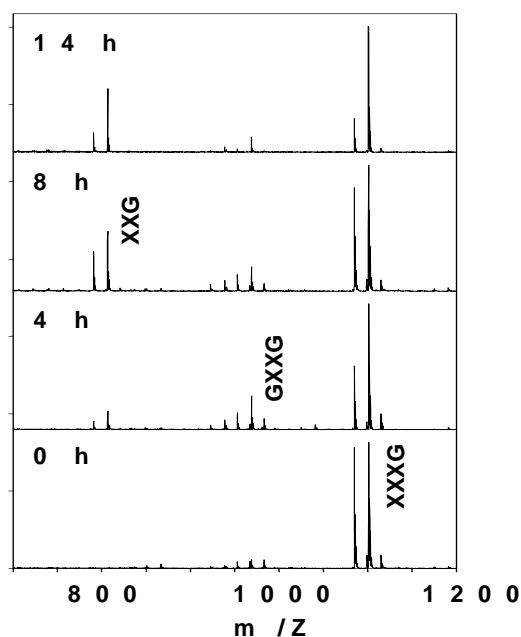


Figura II.11. Análisis mediante MALDI-TOF MS de los productos de digestión obtenidos a partir del oligosacárido XXXG, en distintos tiempos de incubación, 0, 4, 8, 14 horas.

Teniendo en cuenta el orden de aparición de los distintos oligosacáridos producto de la degradación del heptasacárido XXXG, se demuestra que las  $\beta$ -glucosidasas necesitan la actuación previa de la  $\alpha$ -xilosidasa para actuar sobre en extremo no reductor de las cadenas de xiloglucano, ya que elimina el residuo de xilosa que impide la actividad glucosidasa.

Se observa también que a medida que se incrementa el tiempo de incubación, la cantidad relativa de oligosacárido XXXG va disminuyendo. En cambio, se ve incrementada la cantidad de XXG, esto demuestra que existe una gran actividad  $\beta$ -glucosidasa a lo largo del tiempo de incubación. No obstante hay que recordar que dicha actividad necesita la actuación previa de la xilosidasa, esto implica una importante actividad de cooperación entre ambas enzimas. Hay que destacar que los oligosacáridos de xiloglucano obtenidos por la actuación de las diferentes exoglicosidasas juegan un papel muy importante en la definición y expansión celular, en la regulación del crecimiento de la planta y a nivel de desarrollo. De hecho, durante las etapas iniciales del crecimiento de la célula, parece que el xiloglucano se rompe en fragmentos grandes que son degradados a monosacáridos en etapas posteriores de elongación celular.

#### II.3.4. Análisis de mutantes *knockout* mediante MALDI-TOF MS

Trabajos previos de nuestro laboratorio han permitido identificar *AtXYL1* como el gen responsable de codificar la única  $\alpha$ -xilosidasa de *Arabidopsis* capaz de eliminar los restos terminales de xilosa del xiloglucano (Sampedro y col. 2001). Sin embargo, en lo que respecta a la(s)  $\beta$ -glucosidasa(s) de *Arabidopsis* capaces de eliminar la glucosa terminal del xiloglucano, la situación no está clara. Como se ha visto, basándonos en la homología con la secuencia de la  $\beta$ -glucosidasa de *Tropaeolum* activa frente a xiloglucano (Crombie y col., 1998), de las colecciones de mutantes de *Arabidopsis thaliana*, se seleccionaron los mutantes *knockout* correspondientes a las cuatro  $\beta$ -

glucosidasas más próximas a la descrita por Crombie. Se seleccionaron los individuos mediante su resistencia a kanamicina, higromicina o BASTA, según el caso, y se obtuvo la segunda generación. La estructura del xiloglucano de estos mutantes fue estudiada independientemente, para cada individuo descendiente de cada mutante original. La composición oligosacáridica de las paredes celulares de dichos mutantes se obtuvo mediante degradación de sus paredes celulares con una endo- $\beta$ -(1-4)-D-glucanasa, analizando los oligosacáridos producto de la degradación mediante MALDI-TOF MS. En la figura II.12 se muestra el espectro de masas correspondiente a diferentes plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0.

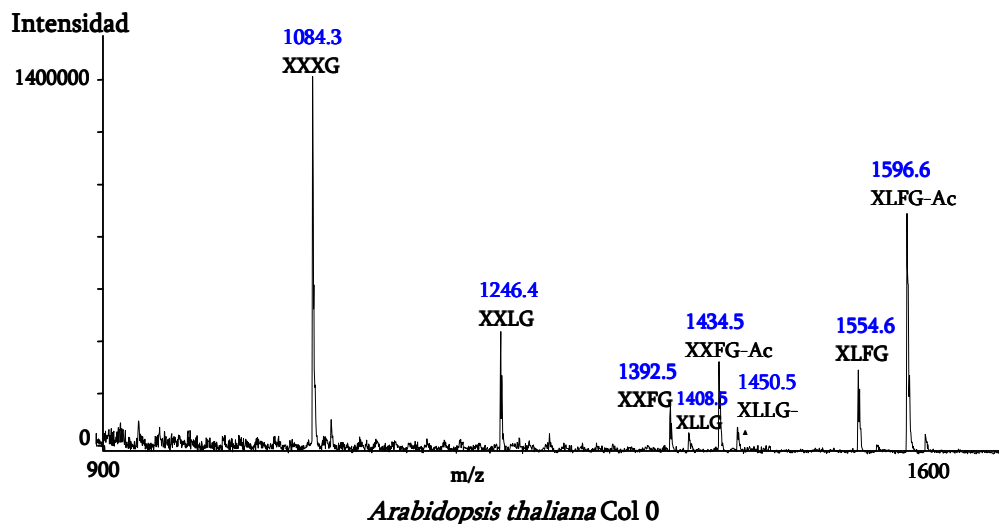
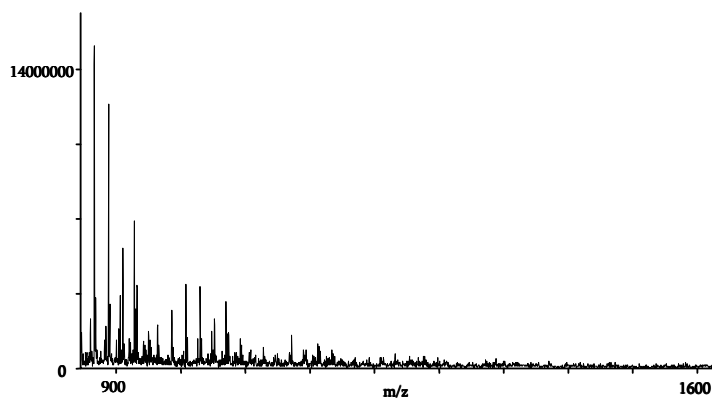


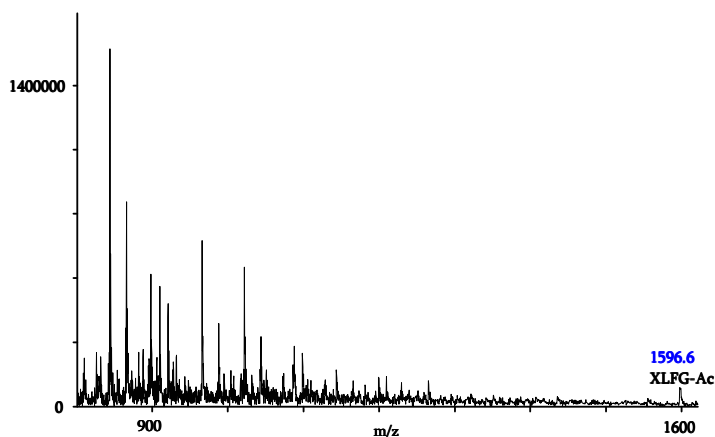
Figura II.12. Espectro de masas correspondiente a los diferentes individuos Columbia 0 utilizados para el análisis de paredes celulares de hojas de roseta basal. La composición de oligosacáridos de los diferentes individuos varía muy poco entre ellos.

En el caso de los individuos correspondientes a Columbia 0, existen diferencias muy pequeñas entre la composición de oligosacáridos de los distintos individuos analizados. En general, los resultados obtenidos mostraron que el oligosacárido mayoritario de su xiloglucano es el heptasacárido XXXG, seguido del oligosacárido XLGF-Ac (Acetilado). En el caso de los individuos mutantes, no sólo se

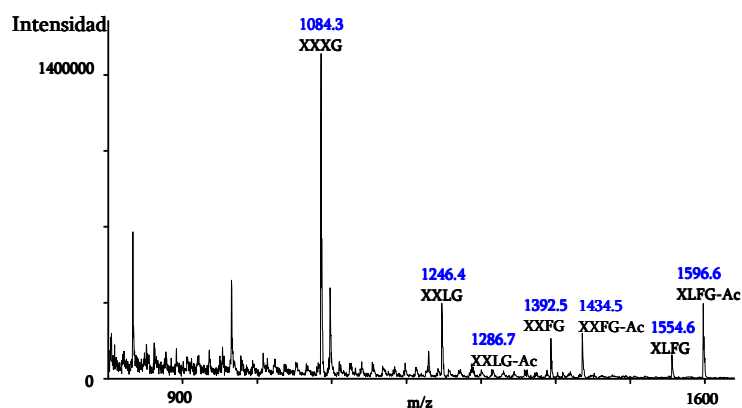
observaron diferencias con el silvestre, sino también entre los individuos descendientes de los originales obtenidos de las colecciones públicas. Se obtuvieron espectros muy diferentes a los obtenidos en el silvestre, algunos de ellos se muestran en la figura II.13. Los espectros presentan una gran variabilidad y es notable la diferencia con Col 0.



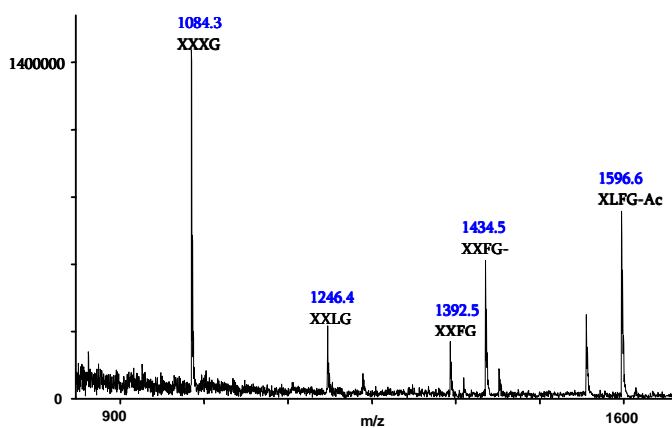
Individuo descendiente del mutante en el gen *AtBGLC1*



Individuo descendiente del mutante en el gen *AtBGLC2*



Individuo descendiente del mutante en el gen *AtBGLC3*



Individuo descendiente del mutante en el gen *AtBGLC4*

Figura II.13. Espectros de masas obtenidos en el análisis de paredes de mutantes *knockout* de posibles  $\beta$ -glucosidasas de *Arabidopsis thaliana*, se observan grandes diferencias con respecto al silvestre Col 0 en cuanto a composición de oligosacáridos.

### II.3.5. Análisis de componentes principales

Utilizando de los espectros obtenidos mediante MALDI-TOF, correspondientes a los diferentes individuos mutantes, con el programa Win-Das se llevó a cabo un análisis de componentes principales. En la figura II.14 A, se muestran las poblaciones correspondientes a los mutantes

de cada  $\beta$ -glucosidasa y la correspondiente a Col 0. Las mayores diferencias con el silvestre se observan en las poblaciones de mutantes de los genes *AtBGLC1*, *AtBGLC2* y *AtBGLC4*.

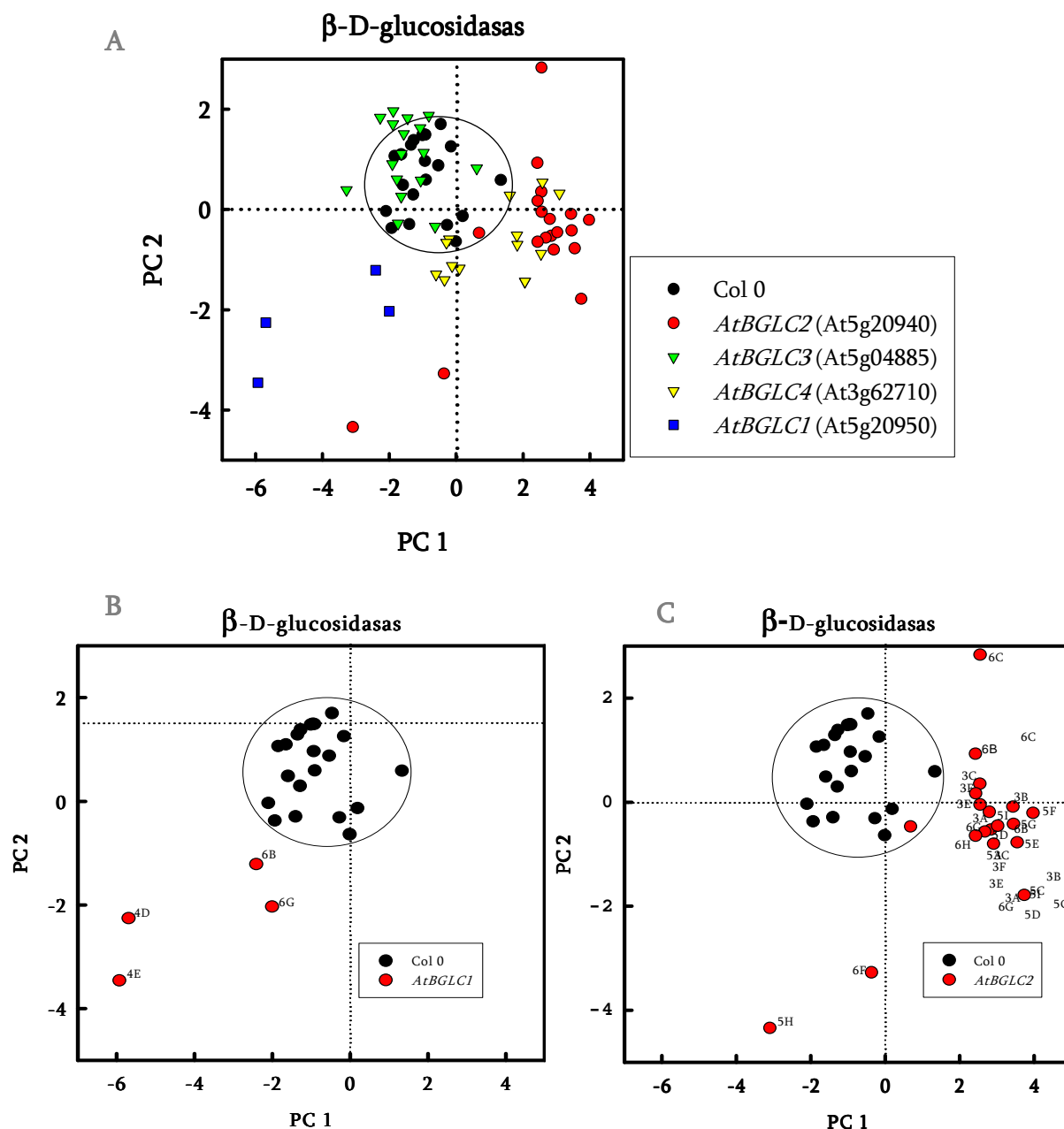


Figura II.14. A. Análisis mediante Win-Das de los espectros de masas correspondientes a plantas individuales descendientes de los diferentes mutantes originales. La gráfica en la que se comparan las diferentes poblaciones resultantes, fue obtenida utilizando el SigmaPlot. La población correspondiente a los individuos control (Columbia 0) aparecen rodeados con un círculo. B y C. Análisis de los mutantes correspondientes a los genes *AtBGLC1* y *AtBGLC2*, en los que se observan con detalle los individuos con mayores diferencias respecto a la población de Columbia 0.

Cada uno de los puntos que forman las cuatro poblaciones que se muestran en la gráfica II.14.A, corresponden a una planta individual, de la que se ha analizado su xiloglucano. Cada planta se designa con un número y una letra. Los criterios de selección de los individuos mutantes de cada gen, fueron en base a dos características fundamentales: que su xiloglucano fuese muy diferente al de la población control y/o que presentasen diferencias fenotípicas importantes con respecto a Columbia 0. A nivel fenotípico se observó que algunos individuos mutantes presentaban una reducción del tamaño con respecto al silvestre; mientras que otros presentaban un tamaño considerablemente mayor para plantas de la misma edad. Algunos de los *knockout* seleccionados fueron *Atbglc1* 4D, 4E y 6B, o *Atbglc2* 6F (figura II.14 B y C) fundamentalmente, en base a diferencias en la estructura de su xiloglucano con respecto al control.

Un mismo individuo podría presentar simultáneamente diferencias a nivel fenotípico y a nivel de composición oligosacáridica, mientras que en otros casos la diferencia se produciría sólo en uno u otro nivel. Es posible que las alteraciones fenotípicas en algunos casos puedan ser producto de la mutación, lo cual nos permitiría establecer los efectos a nivel de la planta provocados por la glucosidasa mutada.

Se podría establecer una relación entre la composición del xiloglucano de la pared de las plantas más diferentes al control y la afuncionalidad de la glucosidasa mutada. Este análisis nos permitió seleccionar varios individuos de cada mutante y centrar en ellos posteriores estudios, de actividad, fenotipo, crecimiento, composición de azúcares o expresión. Estos estudios nos permitirán aproximarnos a la/s  $\beta$ -glucosidasa/s que actúan sobre xiloglucano en *Arabidopsis thaliana*.



Como hemos visto en este capítulo, la selección de las diferentes  $\beta$ -glucosidasas de *Arabidopsis thaliana* se llevó a cabo en base a la similitud de las mismas con la identificada en *Tropaeolum majus* con actividad demostrada sobre xiloglucano. Esta similitud junto con los estudios de expresión nos aporta datos a cerca de la posible implicación de las mismas en el metabolismo del xiloglucano y en el crecimiento celular. Los resultados obtenidos

mediante PCR en tiempo real parecen indicar que las cuatro  $\beta$ -glucosidasas estarían implicadas en mayor o menor medida en el desarrollo de la planta. Por otro lado, el análisis del xiloglucano de diferentes mutantes nos ha aportado datos interesantes sobre las posibles alteraciones causadas por dicha mutación. De esta forma se han podido seleccionar diferentes individuos mutantes con características interesantes.

*Capítulo III: Estudio de los mutantes knockout de las  $\beta$ -glucosidasas de Arabidopsis thaliana*



### III.1. Introducción

Los mutantes de pared celular nos permiten determinar las consecuencias, a diferentes niveles, de la alteración en un gen determinado. Dicha alteración puede ser provocada mediante inserción o delección. Los mutantes que hemos utilizado en este trabajo, pertenecen al primer grupo (Alonso y col., 2003). Los mutantes de inserción, adquiridos en las colecciones públicas, son de dos tipos: mutantes de T-DNA y mutantes generados por introducción de un transposón en el gen objeto de estudio (Fedoroff y Smith, 1993).

Los mutantes de T-DNA, suelen llevar una inserción de DNA de aproximadamente 1kb, para asegurar la mutación en el gen que se quiere afectar. La forma de obtener los mutantes de T-DNA suele ser por infiltración a vacío, la inserción aporta a la planta mutada algún tipo de resistencia que permite seleccionarla, como ya se vio en el capítulo previo (Sessions y col., 2002). En el caso de los mutantes de transposón, el tamaño del mismo es mayor, unas 2-3 kb, pudiendo llegar incluso a las 5 kb, lo cual implica que podría afectar a más de un gen, sobre todo si están en tándem. Además, podría haber más de un transposón en el genoma de la planta mutada. Por eso es importante comprobar que exista un solo transposón y que afecte solamente al gen de interés, ya que podría cambiar de posición en el genoma de la planta (Fedoroff y Smith, 1993).

Como vimos en el capítulo II, en nuestro trabajo utilizamos ambos tipos de mutantes.

No todos los mutantes van a presentar fenotipo diferente al individuo silvestre, es decir, la mutación no siempre es patente. A veces aparece a nivel de composición, estructura o función. En nuestro caso, como ya vimos, la selección de nuestros mutantes se basó en la diferente composición de oligosacáridos del xiloglucano de la pared celular.

En *Arabidopsis* se han obtenido resultados muy importantes utilizando diferentes colecciones de mutantes. Los mutantes *mur* fueron aislados en los 90 y presentan cambios a nivel de composición de monosacáridos de la pared celular (Reiter y col., 1997). Para identificarlos se llevó a cabo un estudio de paredes celulares hidrolizadas, analizando la composición monosacáridica mediante cromatografía de gases a partir de los correspondientes acetatos de alditol. Se estudiaron los mutantes *mur1* a *mur11*. Las líneas *mur* caen en tres grandes grupos: (1) ausencia completa de un monosacárido (2) reducción significativa en la cantidad de un solo monosacárido (3) alteraciones en las cantidades relativas de varios monosacáridos. Los mutantes *mur1*, *mur2* y *mur3* presentan reducciones en la cantidad de un solo monosacárido, concretamente la fucosa. *mur4*, *mur5*, *mur6* y *mur7*, tienen reducida la arabinosa y *mur8* la ramnosa. Los mutantes con cambios complejos en

la composición de monosacáridos son *mur9*, *mur10* y *mur11*. Cabe destacar que la mayor parte de estas líneas mutantes no presentan cambios morfológicos o fisiológicos obvios. La disponibilidad de estos mutantes permite estudiar la función de los monosacáridos en la pared celular así como los genes relacionados con dichas mutaciones.

Un mecanismo de identificación rápida de mutantes de *Arabidopsis* mediante técnicas analíticas es el FTIR (Fourier Transform InfraRed) o espectroscopía de infrarrojo. Permite una rápida identificación y clasificación de mutantes que presentan una estructura alterada de la pared celular. Este método permite detectar una amplia gama de alteraciones de la pared. Los espectros FTIR se pueden usar para detectar diversas clases de mutantes de pared o para caracterizar cambios en la misma a nivel microscópico que aún no han sido identificados. Los mutantes se clasifican en clusters de alteración utilizando métodos estadísticos complejos para tratar los datos obtenidos (Mouille y col., 2003).

Además de los mutantes mencionados, hay otros mutantes de pared pertenecientes a la colección *Fragile Fiber* (Zhong y col., 2004) o mutantes *Fra*. Han sido encontrados mediante búsqueda de alteraciones fenotípicas relacionadas con propiedades de extensión de la planta. La

mutación *fra3* provoca una reducción drástica del grosor de la pared celular además de otros efectos de menor importancia.

En nuestro trabajo, estudiamos diferentes mutantes de xiloglucano, que contienen la mutación en los genes que codifican para posibles  $\beta$ -glucosidasas de *Arabidopsis thaliana*, a fin de demostrar si alguna de ellas tiene actividad sobre el xiloglucano. Para ello, comprobamos si nuestros mutantes presentan una actividad glucosidasa alterada, es decir, si aparecen diferencias significativas con respecto al control. Comprobando al mismo tiempo si las cantidades relativas los oligosacáridos producto de dicha actividad son también distintas.

Alguno de los mutantes en estudio, presentaron actividad glucosidasa afectada. Posteriormente se comprobó que dichos mutantes eran homocigotos pudiendo asociar la mutación en un gen determinado con las alteraciones observadas a diferentes niveles. Para los mutantes de interés se llevaron a cabo análisis de expresión, caracterización fenotípica mediante la realización de cortes histológicos, cinética de crecimiento de los mismos y composición de azúcares de los diferentes mutantes seleccionados.

## III.2. Materiales y Métodos

### III.2.1. Material biológico utilizado

Como ya se explicó en el capítulo II, el material empleado fueron plantas de *Arabidopsis* mutantes obtenidas de semillas procedentes de distintas colecciones públicas. Todos los mutantes utilizados para los distintos genes en estudio son de inserción (Ito y col., 2002). El mutante correspondiente al gen *AtBGLC1* (Cód. 52-0513-1) procede del RIKEN Bioresource Center y fue obtenido por inserción de un transposón en el primer exón de dicho gen, presentando resistencia a higromicina. El mutante del gen *AtBGLC2* (Cód. CS840053) es del SAIL (Syngenta *Arabidopsis* Insertion Library), tiene una inserción en el primer exón y es resistente a BASTA. En cuanto a *AtBGLC3* (Cód. CS800645) también se obtuvo del SAIL, presenta la inserción en el primer exón y es resistente a BASTA. Y finalmente en el caso del mutante del gen *AtBGLC4* (Cód. CS116040) fue obtenido del JIC (John Innes Center) presenta una sola inserción en el octavo exón (último) y es resistente, al igual que los dos anteriores, a BASTA. Las plantas

utilizadas corresponden a semillas descendientes de la tercera generación de plantas resistentes obtenidas a partir de las semillas originales. Unos mutantes fueron seleccionados mediante siembra en placa, con medio MS, agar al 1% y suplementadas con el antibiótico correspondiente. Otras plantas mutantes fueron seleccionadas mediante siembra en tierra, crecimiento en fitotrón con un fotoperíodo 16:8 (luz/oscuridad) y 25°C. Estas plantas fueron rociadas con BASTA como se explicó en el capítulo anterior.

### III.2.2. Actividad $\beta$ -glucosidasa frente a xiloglucano

Para determinar la actividad  $\beta$ -glucosidasa frente a oligosacáridos de xiloglucano, se obtuvo el extracto apoplástico de los diferentes mutantes de la tabla III.1. La obtención del mismo se llevó a cabo según lo explicado en el capítulo II (II.2.6), siguiendo el método de Monroe y col. (Monroe y col., 1999), adaptado para *Arabidopsis* por Sampedro y col. (Sampedro y col., 2001). Se utilizaron 200 mg de semillas de mutante y se obtuvo un volumen final de 200  $\mu$ l de apoplasto concentrado.

Gen mutado	Individuo mutante seleccionado				
<i>AtBGLC1</i>	4D	4E	6B		
<i>AtBGLC2</i>	5H	6F			
<i>AtBGLC3</i>	1F	1G	1H	3D	3I
<i>AtBGLC4</i>	1B	2D	2G		

Tabla III.1. Se muestran los individuos seleccionados correspondientes a cada uno de los genes mutados, pertenecientes a la generación T3, descendiente del mutante original.

El sustrato utilizado, fue el oligosacárido XXXG obtenido de *Tamarindus indica*, según se describe en el capítulo II (apartado II.2.7). La actividad  $\beta$ -glucosidasa de cada uno de los mutantes frente al oligosacárido *in vivo* se ensayó según el protocolo explicado en capítulo II (apartado II.2.11). Se mezclaron 20  $\mu$ l del extracto apoplástico de los distintos mutantes con 10  $\mu$ l de oligosacárido XXXG (1  $\mu$ g/ $\mu$ l). La reacción se llevó a cabo durante 14 horas. Finalmente se separó una alícuota de 2  $\mu$ l que se analizó mediante MALDI-TOF MS.

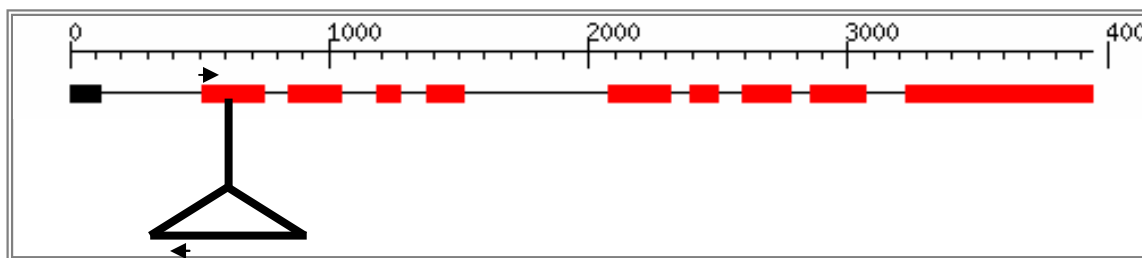
### III.2.3. Extracción de DNA

Se extrajo DNA a partir de hojas jóvenes utilizando para ello el DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen siguiendo las instrucciones del

fabricante. La extracción se hizo tanto a partir de las plantas silvestres (Columbia 0) como del mutante *Atbglc1 4D*.

### III.2.4. Análisis de los mutantes mediante PCR

Para demostrar la homocigosis del mutante seleccionado, se llevó a cabo una PCR que nos permitió determinar la presencia del inserto en el gen mutado y su orientación. Este mutante se originó, como se mencionó anteriormente, por inserción de un transposón en el primer exón del gen *AtBGLC1* (Cód. 52.0513-1) (Fig III. 1).



**Figura III.1.** Localización de la inserción, se trata de un transposón Ds, en el primer exón del gen *AtBGLC1*.

Se localizó el lugar de la inserción, y se diseñaron cebadores a ambos lados de la inserción partiendo de la secuencia genómica completa, obtenida de la base de datos <http://www.arabidopsis.org/>. Los cebadores diseñados amplifican una región de unas 896 pb y se denominaron PeFL y PdFL. Además se utilizó un cebador interno, dentro del

transposón, denominado PdTR, que junto con el cebador PeFL amplifica una región de unas 490 pb. (Tabla III.2). En las reacciones se utilizó el kit Fast Start Taq DNA Polymerase de Roche con un volumen final de reacción de 50  $\mu$ l y las siguientes condiciones: 95 °C, 4 min; 35 ciclos de 95 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 45 s, seguidos de 7 min a 72 °C.

Nombre	Secuencia
PeFL	5' GGGTGAACATGGTCAATGAGATTC 3'
PdFL	5' CAGTCATTCATTGCCAGACAGG 3'
PdTR	5' GGGTGAACATGGTCAATGAGATTC 3'

**Tabla III.2.** Secuencias de los cebadores utilizados en la RT-PCR.



### III.2.5. Niveles de transcriptos

Los niveles de expresión se midieron mediante RT-PCR. Se partió de hojas jóvenes de la roseta basal de unos 20 días de edad y el RNA se extrajo mediante el RNeasy Plant Mini Kit de Quiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA se cuantificó por absorbancia a 260 nm. El cDNA se sintetizó utilizando el 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) de Roche siguiendo las instrucciones del fabricante, y utilizando 1  $\mu$ g de RNA total. A continuación se llevó a cabo una PCR sobre el cDNA obtenido. Se diseñaron cebadores sobre el cDNA del gen

*AtBGLC2* que amplifican una región de unas 350 pb y que en el DNA genómico contiene un intrón en medio, para detectar posibles contaminaciones con DNA. Aunque cabe destacar que sería difícil que se produjesen tales contaminaciones, ya que el RNA es tratado con una DNAsa tras su extracción. Los cebadores utilizados aparecen en la tabla III.3. Se llevó a cabo una PCR convencional utilizando el kit Fast Start Taq DNA Polymerase de Roche. Las condiciones fueron las siguientes: 95 °C, 4 min; 35 ciclos de 95 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 30 s, seguidos de 7 min a 72 °C.

Nombre	Secuencia
Pe40	5- CGTAATAAAGTACCACTCGCAAACGCC -3'
Pd40	5'- CAGGACCGATATATGGCTTC -3'

Tabla III.3. Cebadores utilizados para la amplificación por PCR del gen *AtBGLC1*. El producto de la amplificación es de unas 350 pb.

### III.2.6. Análisis fenotípico de los mutantes seleccionados

Se realizaron cinéticas de crecimiento tanto de roseta basal como de raíces, de aquellos mutantes que presentaban un fenotipo más evidente. Para llevar a cabo la medida de la roseta basal se esperó a que el primer par de hojas verdaderas alcanzara un tamaño adecuado y se procedió a la toma de fotografías en días consecutivos. Las medidas

se realizaron con el programa Scion ([www.scioncorp.com](http://www.scioncorp.com)), previamente calibrado. En el caso de raíces se midieron manualmente a lo largo de la raíz principal.

También se tomaron fotos de diferentes plantas, que se compararon con el tipo silvestre. Además se tomaron fotos de hojas del mutante y se compararon con el silvestre, para poder apreciar diferencias de tamaño.

### III.2.7. Amplificación de la región promotora de los genes de interés

Mediante PCR se obtuvo un fragmento de unas 2123 pb del promotor del gen *AtBGLC1* y unas 1141 pb del promotor del gen *AtBGLC2*, situados 174 y 33 pb antes del ATG respectivamente. Los cebadores utilizados fueron los que aparecen en la tabla III.4. En el extremo 5' de los cebadores aparecen secuencias marcadas en rojo que corresponden

a dianas de restricción de las enzimas indicadas en dicha tabla. Partiendo de 100 ng de DNA, se utilizó la polimerasa Pwo de Roche ([www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 94°C, 2 min; 30 ciclos de 94°C, 30s; 62°C, 30s; 72°C, 1 min 45 s, seguidos de 72°C durante 15 min.

Cebadores	Secuencias	Diana de Restricción
PeProm50	5'TATTGGATCCTGACTTCAGGTGTAGCGAC 3'	BamHI
PdProm50	5'AACCGAATTCATGCACTGGCTACAAAAT 3'	EcoRI
PeProm40	5' AGCTAAGCTTGTACAGCAGAGCAGCAGAAG 3'	HindIII
PdProm40	5'AAGTGGATCCGGACGTGGTTTAAGTC 3'	EcoRI

Tabla III.4. Cebadores utilizados para amplificar los fragmentos correspondientes a los promotores de los dos genes objeto de estudio.

### III.2.8. Clonación en el vector pCAMBIA 1381z T-DNA

El producto de PCR obtenido mediante la amplificación de 2123 y 1141 pb de la región del promotor de los genes *AtBGLC1* y *AtBGLC2* se purificó a partir de gel de agarosa utilizando en *QIAquick gel extraction kit* de Qiagen. Posteriormente se llevó a cabo la digestión del fragmento obtenido con las enzimas que se indican en la tabla III.4. BamHI y EcoRI en el caso de *AtBGLC1*, y HindIII y EcoRI en el caso de *AtBGLC2*. Todas

las enzimas utilizadas son de Promega ([www.promega.com](http://www.promega.com)). Una vez inactivadas las correspondientes enzimas se purificó el inserto obtenido a través de la columna Montage PCR ([www.millipore.com](http://www.millipore.com)).

Al mismo tiempo el vector de clonación pCAMBIA 1381z T-DNA ([www.cambia.org](http://www.cambia.org)) (fig.III.2), también fue sometido a digestión con las enzimas de restricción correspondientes en cada caso (BamHI y EcoRI, *AtBGLC1*; HindIII y EcoRI, *AtBGLC2*). Al igual que con los insertos en el caso del

plásmido se inactivaron las enzimas, se confirmó su digestión y se purificó a través de

la columna Montage PCR.

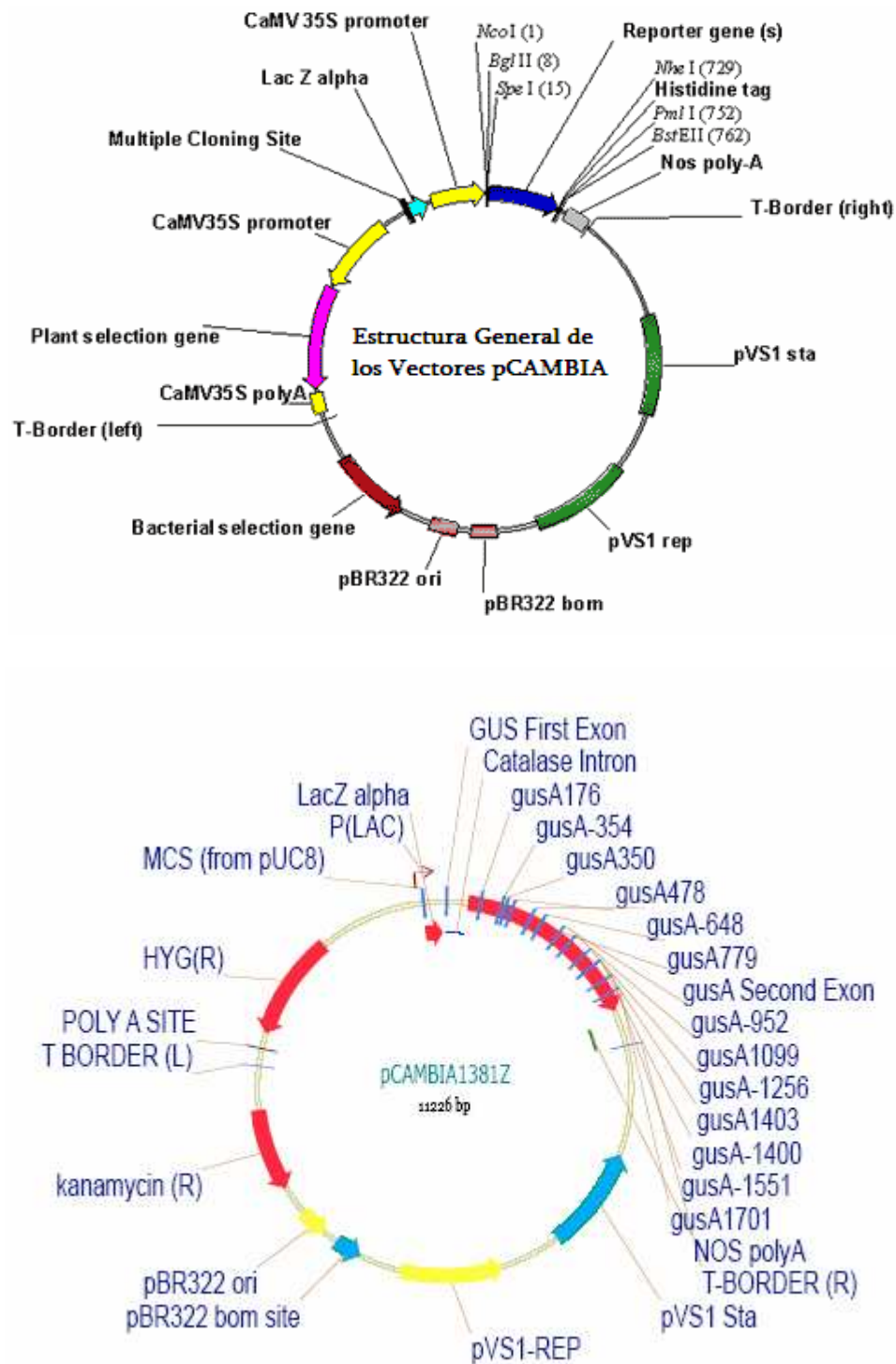


Figura III.2. Arriba estructura general de los vectores pCambia. Abajo estructura detallada del plásmido pCambia 1381z T-DNA.

Para llevar a cabo la ligación se utilizó la T4 DNA ligasa de Promega. En la reacción se utilizó 1  $\mu$ l de plásmido (aproximadamente 100 ng), 2  $\mu$ l de inserto (entre 70-100 ng), 7  $\mu$ l de agua ultrapura, 1  $\mu$ l de tampón T4 ligasa y 0,5  $\mu$ l de ligasa, se incubó la mezcla a 16°C durante 16 h y se inactivó a 70°C durante 15 min.

A continuación realizó la clonación en *Escherichia coli*. Se utilizaron 5  $\mu$ l de la ligación obtenida anteriormente y se incubaron con 50  $\mu$ l de *E.coli* (Estirpe Top10) en hielo durante 30 min. Posteriormente la mezcla se incubó a 42°C durante 90 s y se pasó de nuevo a hielo durante 10 min. A continuación se añadió 1 ml de medio LB y se incubó a 200 rpm y 37°C durante 1 h. El medio LB se compone de: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Posteriormente se sembraron 50  $\mu$ l por placa (LB con kanamicina 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> con X-Gal 20 $\mu$ g/ $\mu$ l).

Para recuperar el DNA plasmídico a partir de *E. coli* se utilizó el “QIAprep spin mini kit” de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos recombinantes, una vez verificadas las construcciones mediante mapeado de restricción y secuenciación, se introdujeron en *Agrobacterium tumefaciens*, línea EHA105, con resistencia a rifampicina (Hood y col., 1993), mediante electroporación.

### III.2.9. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación

Las células competentes que obtuvimos para *Agrobacterium* (línea EHA105) se descongelaron a temperatura ambiente y se pasaron a hielo inmediatamente. Luego se cargaron 50  $\mu$ l en una cubeta de electroporación preincubada a 0°C y se les añadió 1  $\mu$ l de DNA plasmídico con inserto (140-150 ng), se mezclaron mediante pipeteo muy suave y se mantuvieron en hielo.

El electroporador de Bio-rad fue calibrado a 130-200 ohmios y 1.44 kV utilizando una cubeta de 10 mm. Se dio un pulso durante 5 ms. Se añadió 1 ml de medio LB y se transfirió a un vial. Se incubó sin agitación durante una hora. A continuación se sembró en placa conteniendo medio selectivo formado por LB con 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de kanamicina y 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de rifampicina (Sigma).

De las colonias de *Agrobacterium* resistentes a kanamicina y rifampicina se seleccionaron unas 10, para comprobar mediante miniprep y digestión con los enzimas de restricción correspondientes, la presencia del promotor de cada uno de los genes.

Una vez recuperado el plásmido se digirió con las enzimas de restricción adecuadas para la posterior visualización del mapa de restricción en un gel de agarosa. La presencia del inserto se comprobó mediante PCR.

### III.2.10. Transformación de *Arabidopsis thaliana*

La transformación de *Arabidopsis* se llevó a cabo mediante inmersión floral. Se inocularon 5 ml de medio LB (suplementado con 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de kanamicina y 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de rifampicina) con *Agrobacterium tumefaciens* y se creció a 28°C y 200 rpm. Se utilizó 1 ml de este precultivo para inocular 200 ml de medio YEP, y se mantuvo durante 24 h a 28°C y 200 rpm. El medio YEP se compone de: 10 g de extracto de levadura, 10 g de peptona bacteriológica y 5 g de NaCl. Una vez pasadas las 24 h se centrifugó a 4000 *g* durante 10 min a temperatura ambiente y las células se resuspendieron en 400 ml de medio de infiltración que contiene: 1/2x de sales Murashige-Skoog, 1x de vitaminas B5 Gamborg de GIBCO, 5% (w/v) de sacarosa, 0,044  $\mu\text{M}$  de bencilamino purina (10  $\mu\text{g l}^{-1}$  de un stock 1mg  $\text{ml}^{-1}$  en DMSO), 200  $\mu\text{l}$  de Silwet L-77 (0.02%).

Las flores de *Arabidopsis* crecidas en cámara con un fotoperíodo 16:8 luz/oscuridad y 25°C, se sumergieron en el medio de infiltración durante 3 s aproximadamente. Posteriormente las plantas se dejaron tumbadas en bandejas, cubiertas con papel celofán, y en oscuridad durante 24 h. Transcurrido este tiempo se regaron y se volvieron a las condiciones de partida. La

inmersión se repitió a los 5 días. Finalmente se recogieron las semillas.

### III.2.11. Selección y cultivo de plantas

Una vez recogidas las semillas ya secas, se mantuvieron en frío a 4°C durante una semana. Se sembraron en placas suplementadas con higromicina 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , procurando que quedasen lo más dispersas posible para favorecer el análisis estadístico y la no competencia por el antibiótico, ya que se podría favorecer la supervivencia de plantas no transformadas. Las plántulas que sobrevivieron fueron pasadas a tierra, se seleccionaron distintas líneas y se recogieron las semillas para su posterior siembra en placa en las mismas condiciones que sus progenitoras. Se seleccionaron aquellas que presentaban una segregación 3:1 o eran homocigotos, para posteriores estudios de actividad  $\beta$ -glucuronidasa.

### III.2.12. Tinción y fijado de las muestras

Las muestras se recogieron en placas con acetona al 90% a 0°C durante el tiempo que duró la recolección de las mismas. Posteriormente, se mantuvieron 20 min a temperatura ambiente, tras lo cual se retiró la acetona y se lavaron con tampón de teñido a 0°C durante 10 min. El tampón de teñido contiene: fosfato sódico 50

mM pH 7.2, tritón X-100 al 0,2%, ferrocianuro potásico 2 mM y ferricianuro potásico 2 mM. Transcurridos 10 min, se substituyó el tampón de teñido por la solución de tinción, que contiene, tampón de teñido más X-GlcA (2 mM disuelto en DMF), y se mantuvieron en hielo durante 20 min infiltrando a vacío. Para romper el vacío es necesario hacerlo de forma suave y paulatina. Las muestras deben quedar sumergidas en la solución.

A continuación se incubaron en oscuridad a 37°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se eliminó la solución de tinción y se sometieron a varios lavados consecutivos con etanol al 20%, 35% y 50% a temperatura ambiente durante 30 min cada uno. Una vez hechos los lavados con etanol, se incubaron en la solución de fijación durante 30 min a temperatura ambiente. La solución de fijación contiene 50% etanol, 10% de ácido acético glacial y 5% de formaldehído (Weigel y Glazebrook, 2002).

Transcurridos los 30 min la solución de fijación se retiró, se añadió etanol al 70% y se guardaron a 4°C. Transcurridas 2 h se comprobó que los tejidos estuviesen libres de clorofila y se realizaron las fotografías correspondientes.

### **III.2.13. Fijación e inclusión de muestras para microscopía**

Las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.2 durante 1 h a 4°C. A continuación se realizaron dos lavados en tampón cacodilato 0,025 M pH 7,4 y se procedió a la fijación de las muestras con OsO<sub>4</sub> en tampón cacodilato 0,5 M pH 7,4 durante 1 h. A continuación se realizaron tres lavados con tampón cacodilato 0,5 M pH 7,4.

El siguiente paso, fueron series de deshidrataciones en etanol a diferente concentración 30, 50, 70, 90 y 100% (x3) durante 1 h en cada uno de ellos excepto en alcohol al 70% que lleva acetato de uranilo para contrastar las muestras, en el cual se dejan toda la noche.

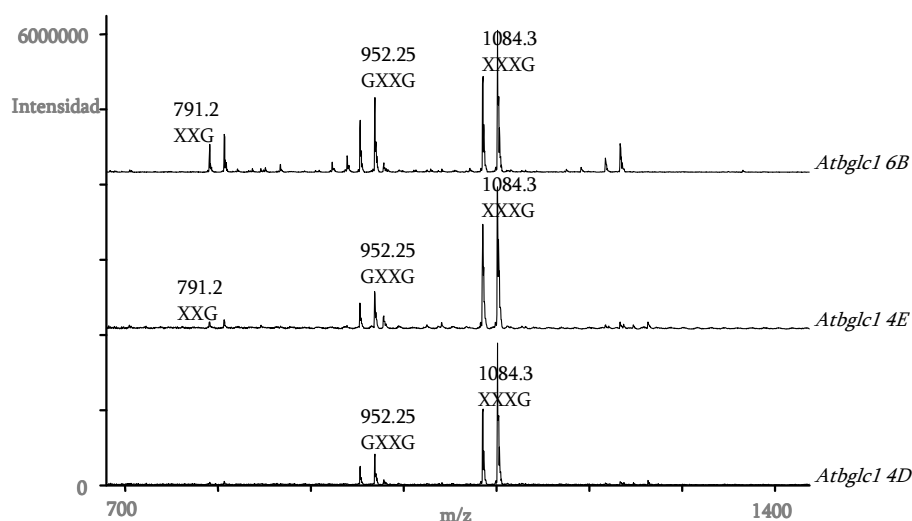
Las muestras se lavaron con óxido de propileno (x2) durante 15 min y se pasaron a una solución compuesta por óxido de propileno: epon (1:1) (v/v) durante 1 h. Esta solución se retiró para sustituirla por epon, en la que se dejaron toda la noche. El siguiente paso fue la construcción de los bloques y la realización de los cortes histológicos de 400 nm de espesor. Los cortes se fijaron en los portas durante 10 min a 40°C, se tiñeron con azul de toluidina y se sellaron con DPX. Los cortes se realizaron con un microtomo LeicaMZ6.

### III.3. Resultados y discusión

#### III.3.1. Actividad de los mutantes *knockout* frente al sustrato XXXG

De cada una de las  $\beta$ -glucosidasas objeto de estudio (AtBGLC1, AtBGLC2, AtBGLC3 y AtBGLC4) se seleccionaron una serie de mutantes en base a diferencias estructurales entre su xiloglucano y el de Columbia 0, a diferencias fenotípicas o bien ambas cosas. Los

mutantes seleccionados se mencionan en el apartado II.2.2 de materiales y métodos. El siguiente paso en nuestro estudio fue el análisis de su actividad frente al heptasacárido XXXG, utilizando el extracto apoplástico de cada uno de ellos (Iglesias y col., 2006). Los espectros de masas de los productos de reacción obtenidos para algunos de los mutantes en estudio se muestran en la figura III.3.



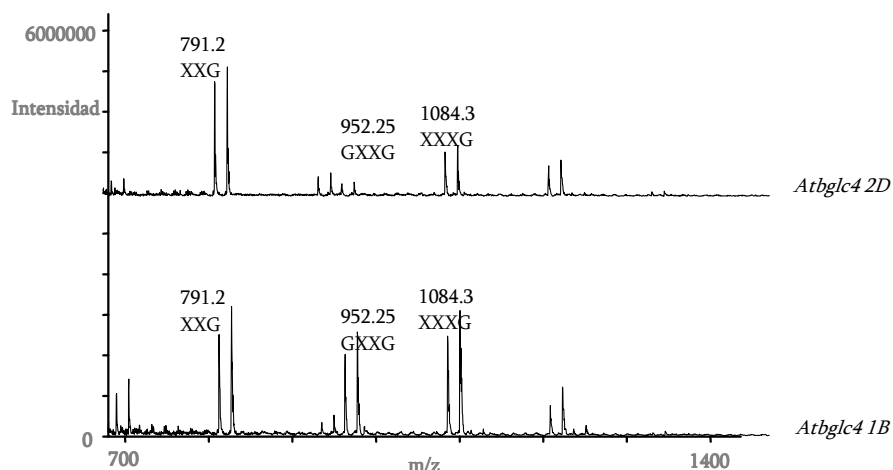


Figura III.3. Espectros de masas correspondientes a algunos individuos mutantes de las distintas  $\beta$ -glucosidasas objeto de estudio. Las incubaciones con el oligosacárido XXXG fueron realizadas durante 14 horas, los productos de digestión obtenidos aparecen en las figuras con su correspondiente ratio m/z.

En primer lugar destaca el hecho de que la actividad  $\alpha$ -xilosidasa (Sampedro y col., 2001), parece no estar afectada en ninguno de los mutantes estudiados correspondientes a  $\beta$ -glucosidasas (Goujon y col., 2003). Por otra parte, cuando se observan los espectros de masas de cada uno de los individuos mutantes por separado, cabe destacar que en todos los correspondientes a los genes *AtBGLC2*, *AtBGLC3* o *AtBGLC4*, aparece el oligosacárido XXG. Este oligo es producto de la actividad  $\beta$ -

glucosidasa, al actuar sobre el oligosacárido GXXG. Este, a su vez, se forma por actividad  $\alpha$ -xilosidasa a partir del heptasacárido XXXG (Minic y Jouanin, 2006). Sin embargo, uno de los individuos correspondientes al mutante en el gen *AtBGLC1*, concretamente, el individuo *Atbglc1 4D*, presenta una ausencia prácticamente total de XXG. Esto sugiere una falta de actividad  $\beta$ -glucosidasa, y por lo tanto puede ser esta la glucosidasa que actúa *in vivo* sobre el xiloglucano y/o sus oligosacáridos.



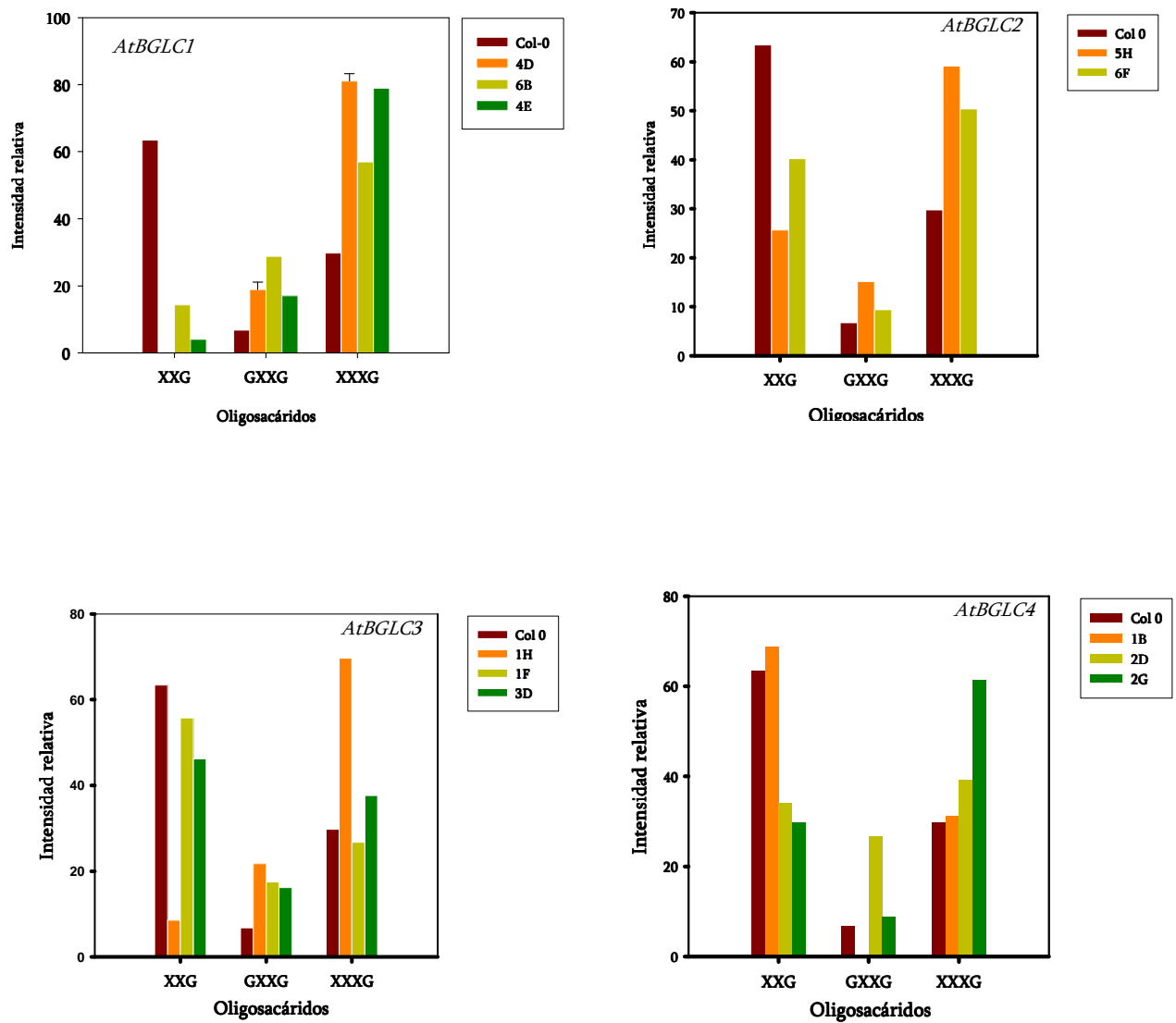


Figura III.4. Se representan los oligosacáridos obtenidos para cada uno de los mutantes de las glucosidasas por separado. En el caso del mutante 4D, se observa la ausencia total de XXG.

En la figura III.4 se muestran en detalle las cantidades relativas de oligosacáridos obtenidas a partir de la incubación del apoplasto de los diferentes individuos frente a XXXG. En el caso del gen *AtBGLC2*, las actividades xilosidasa y glucosidasa aparecen en los dos mutantes analizados, aunque tanto

en el mutante *Atbglc2 6F* como en *Atbglc2 5H*, ambas actividades están disminuidas con respecto a Col-0. En el caso del gen *AtBGLC3*, los mutantes 3D y 1F la degradación del oligosacárido original se produce de un modo similar a Columbia 0, salvo en el individuo *Atbglc3 1H* donde al igual que pasaba en el

*Atbglc2 5H* y *6F*, las actividades xilosidasa y glucosidasa son menores que en el control. Como se observa en la figura, con el gen *AtBGLC4* ocurre lo mismo que en los dos casos anteriores, uno de los individuos, concretamente *Atbglc4 2G* presenta una reducción de las actividades ya mencionadas con respecto al control. Finalmente, los individuos mutantes correspondientes el gen *AtBGLC1*, se diferencian de todos los anteriores, ya que las cantidades relativas del heptasacárido XXXG son mayores que en el control, en todos los individuos analizados. Los oligosacáridos GXXG y XXG aparecen en menor proporción, y no aparece XXG en el caso de *Atbglc1 4D*. Esto indicaría la ausencia de actividad  $\beta$ -glucosidasa en este mutante y por lo tanto, esta  $\beta$ -glucosidasa podría ser la responsable de modificar el xiloglucano, *in vivo*, en *Arabidopsis thaliana* (Fry, 1995). Podría estar implicada, por lo tanto, en la extensión de la pared celular (Cosgrove, 1993).

### III.3.2. Análisis del mutante *Atbglc1 4D* mediante PCR

Como se indica en el apartado anterior, el hecho de que el mutante *Atbglc1 4D*, presente una actividad  $\beta$ -glucosidasa prácticamente nula frente al sustrato GXXG, llevó a pensar que podría ser el producto del gen *AtBGLC1* el responsable de dicha actividad *in vivo* frente al xiloglucano (Edwards y col., 1985). Por eso, se llevó a cabo el análisis de dicho mutante mediante PCR con la finalidad de comprobar que era homocigoto, y por lo tanto, que las variaciones observadas a nivel de actividad se debían a la mutación en el gen correspondiente. Este individuo, procedente del instituto Riken, se originó por inserción de un transposón Ds en el primer exón del gen *AtBGLC1* (Takashi y col., 2004). Una vez localizado el lugar de inserción (Fedoroff y Smith, 1993), se diseñaron los cebadores y se llevaron a cabo las PCR correspondientes, para determinar la presencia del inserto en el gen mutado, su correcta orientación y la homocigosis de la línea mutante correspondiente. Los cebadores empleados son los descritos en el apartado correspondiente de materiales y métodos.

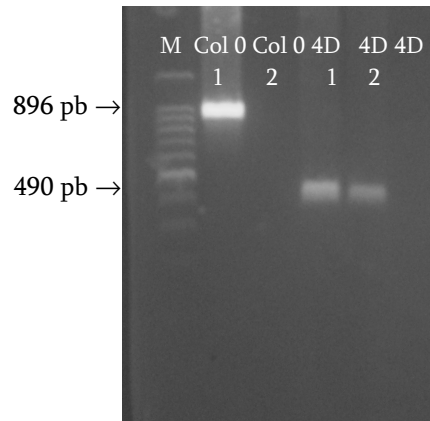


Figura III.5. Gel de agarosa donde se muestran los productos obtenidos mediante amplificación por PCR. Se utilizaron los cebadores PeFl, PdFl y PdTR en silvestre y mutante con la misma edad. En el caso de Col 0 (1) se utilizaron los cebadores flanqueantes del inserto (PeFl y PdFl) y se obtuvo una banda de unas 896 pb. En el caso de Col 0 (2) se utilizó un cebador externo y uno interno dentro del inserto (PeFL y PdTR) de ahí que no aparezca banda. Cuando se utilizan los cebadores PeFl y PdFl en el mutante, no se obtiene banda (4D) y si se obtiene, como era de esperar, con los cebadores PeFl y PdTR, confirmando así la presencia del inserto (4D.1 y 4D.2).

En la figura III.5 se muestra el gel obtenido con los productos de PCR. El DNA del silvestre y del mutante se obtuvo a partir de un *pool* de hojas recogidas al azar de unas cincuenta plantas. En el caso del silvestre, cuando se amplifica utilizando los cebadores que flanquean el inserto, se obtiene una banda, de unas 896 pb como era de esperar, ya que no presenta inserción. Si se intenta amplificar el DNA silvestre utilizando un cebador externo y uno dentro del inserto, no aparece banda, lo cual corrobora la ausencia de inserto en el silvestre. En cambio, en el caso del mutante, en las dos réplicas realizadas 4D.1 y 4D.2, puede observarse la banda correspondiente al producto de PCR obtenido utilizando el cebador externo flanqueante y el interno dentro del transposón. La banda obtenida

presenta el tamaño adecuado, que es de aproximadamente 490 pb. En el caso de la amplificación de DNA de mutantes con los cebadores flanqueantes (4D), no aparece banda, ya que el tamaño sería demasiado grande para la Taq y condiciones de amplificación empleadas. Por lo tanto, de lo que se muestra en el gel de agarosa y de los resultados de actividad enzimática frente al oligosacárido GXXG, se deduce que éste individuo es un homocigoto, que presenta una inserción en el primer exón del gen *AtBGLC1* y que carece de actividad  $\beta$ -glucosidasa. Por lo tanto, dicha mutación podría ser la responsable de la ausencia de actividad, ya que los homocigotos para dicha mutación no presentan actividad frente al sustrato GXXG.

### III.3.3. Expresión del gen *AtBGLC2* en el mutante *Atbglc1 4D*

El siguiente paso en la caracterización del mutante *Atbglc1 4D*, es comprobar que el gen adyacente no está afectado por la mutación y que los resultados obtenidos se deben únicamente a la presencia del transposón en el gen *AtBGLC1*. Para ello se llevó a cabo una RT-PCR. Al igual que en el apartado anterior, las muestras recogidas corresponden a un *pool* de hojas de plantas diferentes, aproximadamente unas cincuenta y que son homocigotas para la inserción. Se extrajo RNA y se obtuvo el cDNA correspondiente tanto de

silvestre como del individuo *Atbglc1 4D*, y se procedió a amplificar una región de aproximadamente unas 350 pb. El gel obtenido se muestra en la figura III.6.

Como se observa en la figura, se produce amplificación a partir de cDNA obtenido tanto a partir de mutante como de silvestre, esto demostraría que el gen *AtBGLC2* se está expresando en el control, como era de esperar. Estos resultados muestran que el gen *AtBGLC2* se expresa con normalidad en el mutante homocigoto *Atbglc1 4D* y por lo tanto, no está afectado por la inserción del transposón en el gen *AtBGLC1*.

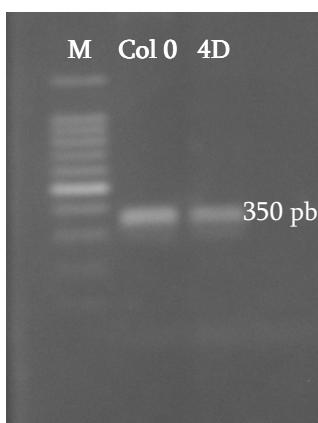


Figura III.6. Gel de agarosa donde se muestran las amplificaciones resultantes de la RT-PCR sobre cDNA de plantas silvestres y de mutante *Atbglc1 4D* amplificando una región del cDNA del gen *AtBGLC2*.

### III.3.4. Análisis fenotípico de los mutantes del gen *AtBGLC1*

Se llevó a cabo un estudio fenotípico de los mutantes seleccionados del gen *AtBGLC1*, el 4D y 6B. En primer lugar se observó que el mutante homocigoto *Atbglc1 4D*, presentaba un tamaño muy superior al silvestre Columbia

0 (Col-0) y Nossen (No-0). Por lo tanto, además de las diferencias a nivel de actividad que ya habíamos observado previamente, presentaba diferencias fenotípicas observables a simple vista. Se compararon plantas silvestres (Col-0 y No-0) y plantas mutantes completas. (Figura.III.7).

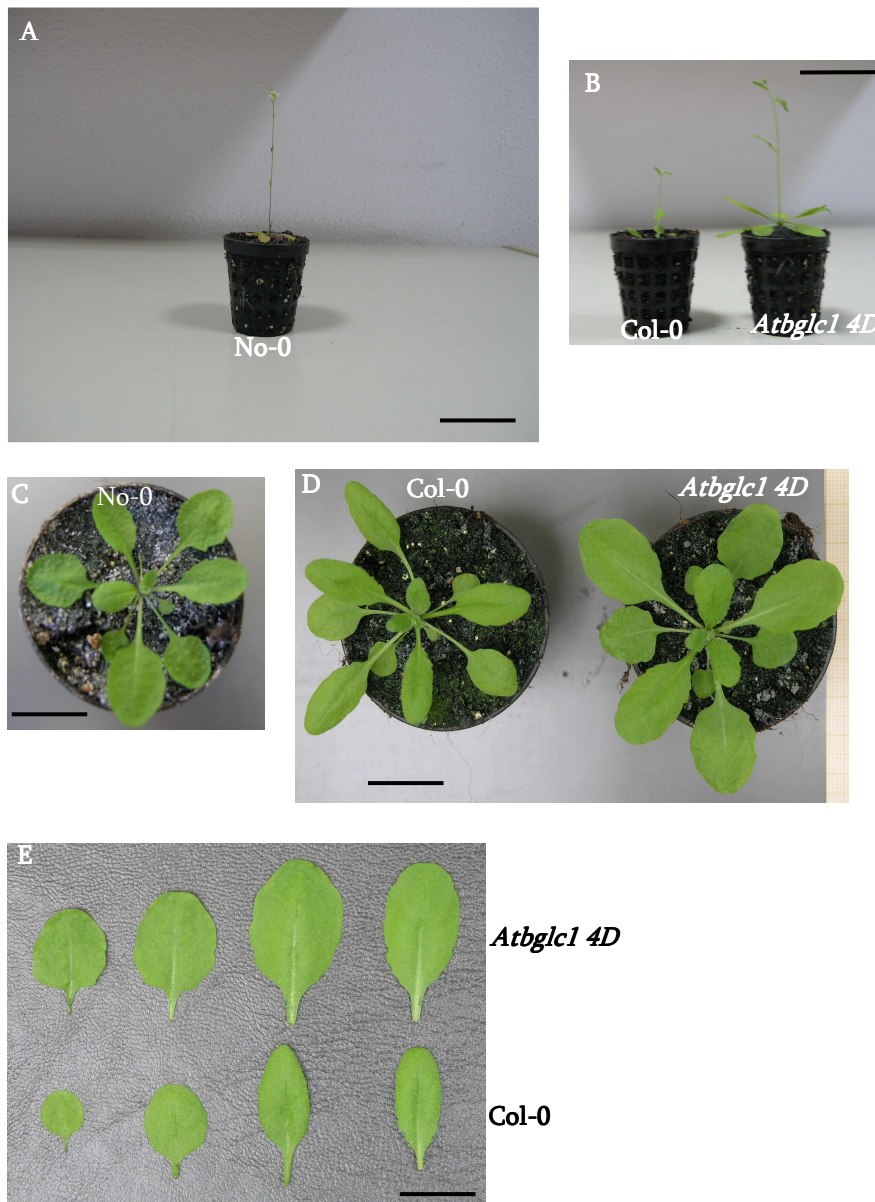


Figura III.7. Se muestran fotografías de roseta basal de plantas silvestres Col-0, No-0 y mutante *Atbglc1 4D*, así como de tallo de plantas de 30 días. También aparece un detalle de hojas de roseta basal de plantas de 21 días de Col-0 frente a mutante *Atbglc1 4D*. Las barras se corresponden con 1 cm.

Si nos fijamos en el tamaño de la roseta basal en relación a las macetas, en las figuras III.7.C y III.7.D, observamos que el tamaño del mutante *Atbglc1 4D* es superior al de Col-0 y No-0. Como puede observarse en la foto, también al cabo de unas cuatro o cinco semanas, cuando aparece el tallo (figuras III.7.A y III.7.B), el mutante sigue presentando un tamaño muy superior a Columbia y Nossen. Se compararon en detalle las hojas de roseta

basal de plantas de unas tres semanas, figura III.7.E, y se observó que las hojas del mutante son de mayor tamaño y además, presentan una forma más redondeada que las de ambos silvestres, que son más alargadas. Se puede afirmar que el mutante presenta un fenotipo diferente al silvestre porque su tamaño es considerablemente mayor y su morfología a nivel foliar es notablemente diferente.

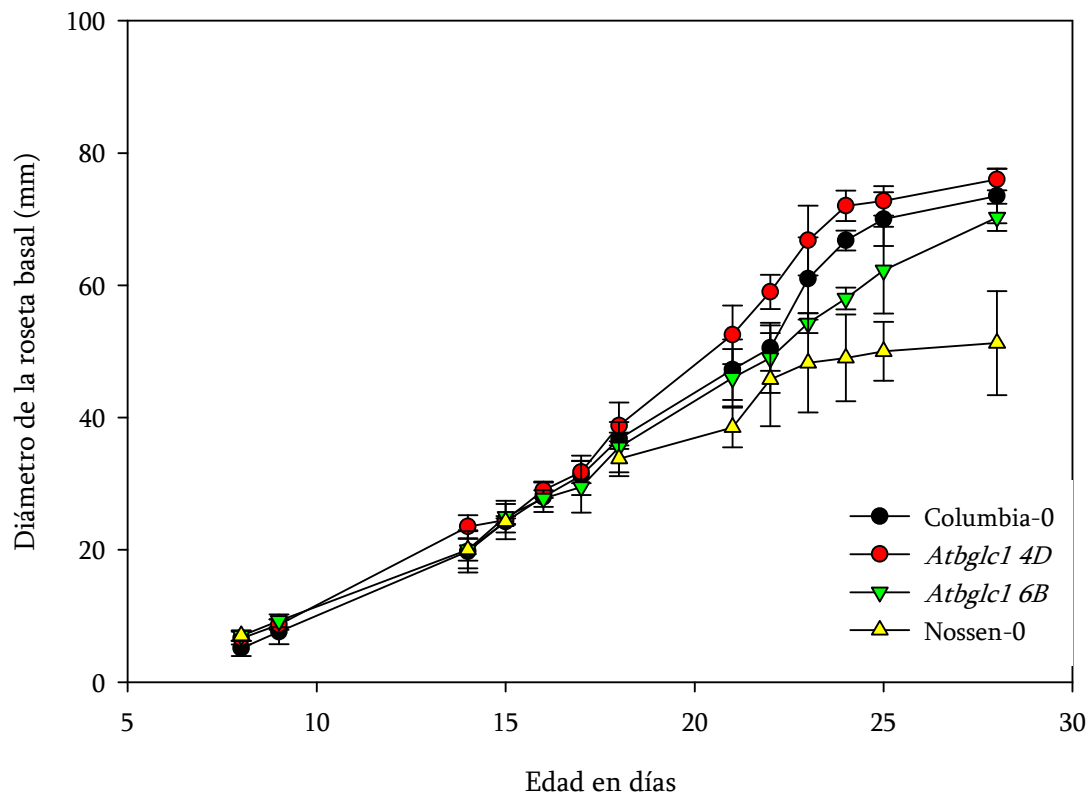


Figura III.8. Cinética de crecimiento de la roseta basal. El crecimiento se expresa como diámetro de la roseta basal.

Se realizó una cinética de crecimiento de la roseta basal de los mutantes *Atbglc1 4D* y *6B* frente a Col-0 y No-0 y los resultados aparecen reflejados en la figura III.8. El objetivo era comprobar si el crecimiento de los mutantes estaba alterado, y como se observa en la figura, se encontraron diferencias significativas con respecto al control. El crecimiento del individuo *Atbglc1 4D* es ligeramente superior al de Col-0 hasta el decimoctavo día de crecimiento, a partir de entonces, el mutante crece más rápido que el control. Se correspondería con el estadio de desarrollo de la roseta basal previo a la aparición del tallo. En el caso del mutante *Atbglc1 6B*, no presenta diferencias significativas con respecto a Col-0, aunque su tamaño final sea ligeramente inferior. Si comparamos el crecimiento de la roseta basal de los ecotipos No-0 y Col-0, observamos que el desarrollo de No-0 es menor que el de Col-0. Cuando comparamos la velocidad de crecimiento de los mutantes *Atbglc1 4D* y *6B*,

observamos que en ambos casos es superior a la de No-0, siendo notablemente superior en el individuo *Atbglc1 4D*. De estos resultados se deduce que el mutante *Atbglc1 4D*, no sólo presenta un mayor tamaño con respecto a Col-0 y No-0 sino una velocidad de crecimiento superior.

En cuanto al crecimiento de raíces, figura III.9, como se observa en la figura, la velocidad de crecimiento es muy superior en el mutante *Atbglc1 4D* con respecto a Col-0 y No-0. A partir de los 10-11 días la pendiente es superior en el caso del mutante. La velocidad de crecimiento vuelve a ser similar a partir de los 15 días aproximadamente. El tamaño de las raíces es muy superior al tamaño de las del control. Se podría decir entonces, que las raíces del mutante 4D son más grandes y crecen más rápido que las del silvestre Col 0. En cuanto a No-0, las raíces tienen una velocidad de crecimiento similar a Col-0 y por lo tanto menor que en el caso de *Atbglc1 4D*.

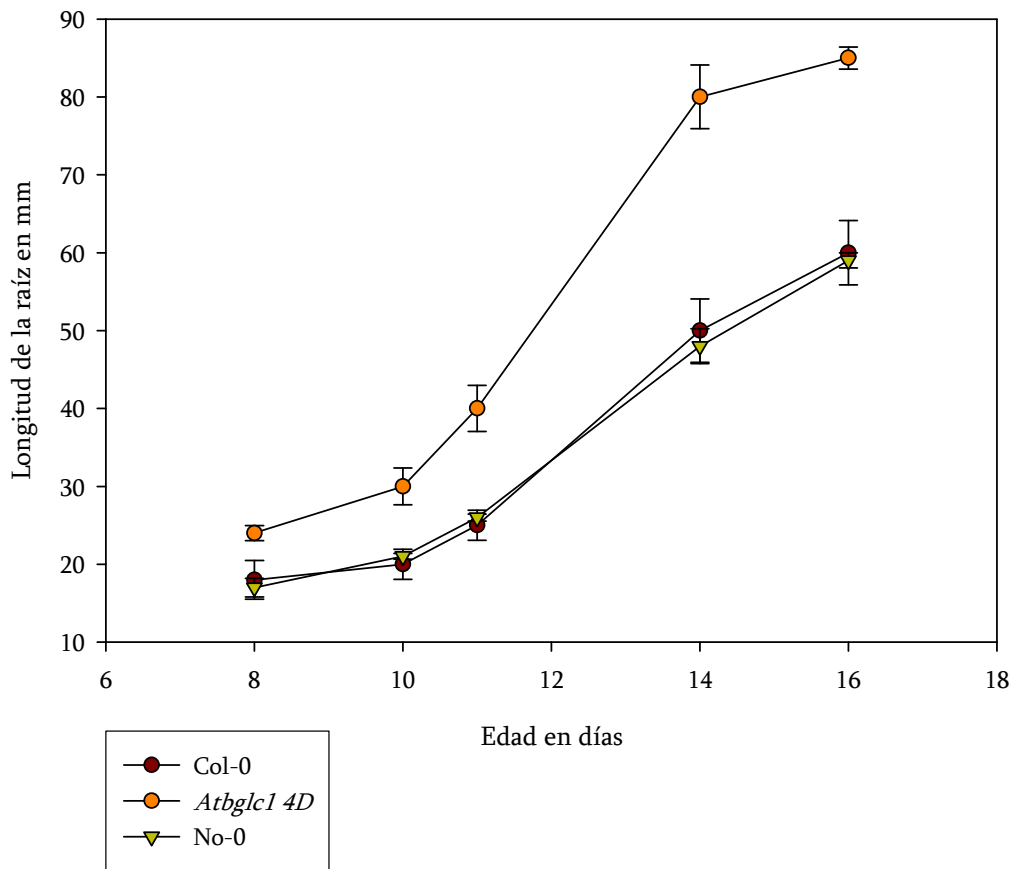


Figura III.9. Cinética de crecimiento en raíces. Se compara el mutante *Atbg1c1 4D* con el silvestre Col-0 y No-0.

### III.3.5. Análisis de expresión de los genes *AtBGLC1* y *AtBGLC2*

Para llevar a cabo el estudio de los genes *AtBGLC1* y *AtBGLC2* se aislaron y clonaron las secuencias intergénicas completas previas a los genes objeto de estudio. Posteriormente se subclonaron en el plásmido pCAMBIA1381z, y la construcción resultante se introdujo en *Arabidopsis thaliana*. Para todo esto, se siguieron los protocolos detallados en los

apartados correspondientes de materiales y métodos. En la generación T2 descendiente de la planta transformada, se comprobó que la resistencia al antibiótico correspondiente presentaba la proporción 3:1. Finalmente se alcanzó la generación T3 en la que todas las plantas eran resistentes, y fueron estos individuos homocigotos los que se utilizaron para los posteriores estudios.



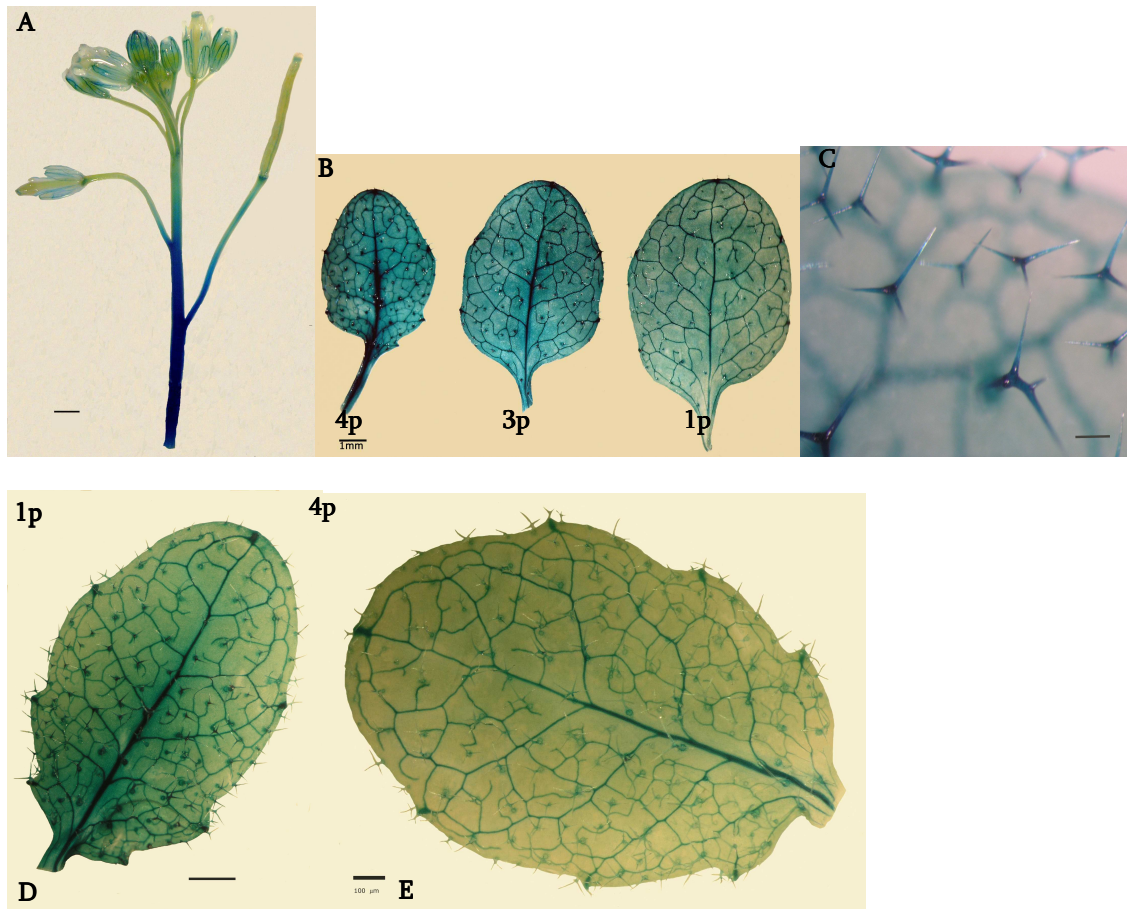


Figura III.10. Actividad GUS en diferentes partes de la planta para los genes *AtBGLC1* (a, b, c) y *AtBGLC2* (d, e). Las barras se corresponden con 1mm. La planta de la figura A tiene 30 días, mientras que el resto de figuras corresponden a plantas de 21 días.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura III.10. Los niveles de expresión de ambos genes en diferentes partes de la planta son relativamente bajos. En algunas partes la expresión es nula. Los dos genes se expresan en hojas, pero parece que en mayor medida lo hacen en las jóvenes, correspondientes al cuarto par. En el caso del gen *AtBGLC1*, se observa que hay una gradación clara entre el primero y el cuarto par. En la figura se muestra además el tercer par, que presenta coloración

intermedia entre los dos anteriores. Por lo tanto se podría decir que la mayor expresión de este gen se produce en hojas en desarrollo. En la figura se muestra además, la parte apical de una planta de aproximadamente unas semanas. En la planta aparece teñido todo el tallo excepto la parte apical, y luego desaparece la coloración, también se observa cierta coloración en las flores, aunque de poca intensidad, lo que podría ser indicativo de una mínima expresión. Se tiñeron diferentes

secciones del tallo, de 1 cm, y se observó que se teñían completamente. Como se observa en la figura la silicua no aparece coloreada, solo en la parte basal que la une con el tallo. Se puede ver también un detalle de los tricomas, que presentan coloración en su base. La intensidad de la coloración es menor hacia el ápice de las ramificaciones de los tricomas. En el caso del gen *AtBGLC2*, se muestra expresión en hojas, aunque la expresión tampoco aparece en muchas partes de la planta. En hojas se observa una mayor coloración en hojas jóvenes, además, aparece fundamentalmente en las nerviaciones. El hecho de que la expresión pueda ser mayor en hojas en crecimiento activo, podría ser indicativo de la implicación de estos genes en el crecimiento de la planta debido a que se expresarían en zonas en desarrollo. En el caso del gen *AtBGLC1*, estos resultados estarían en concordancia con la idea de que uno de los mutantes de este gen pueda ser el responsable de la actividad  $\beta$ -glucosidasa en *Arabidopsis thaliana* y por lo tanto implicado en el crecimiento y extensión de la pared celular.

### III.3.6. Fenotipo histológico del mutante *Atbglc1 4D*

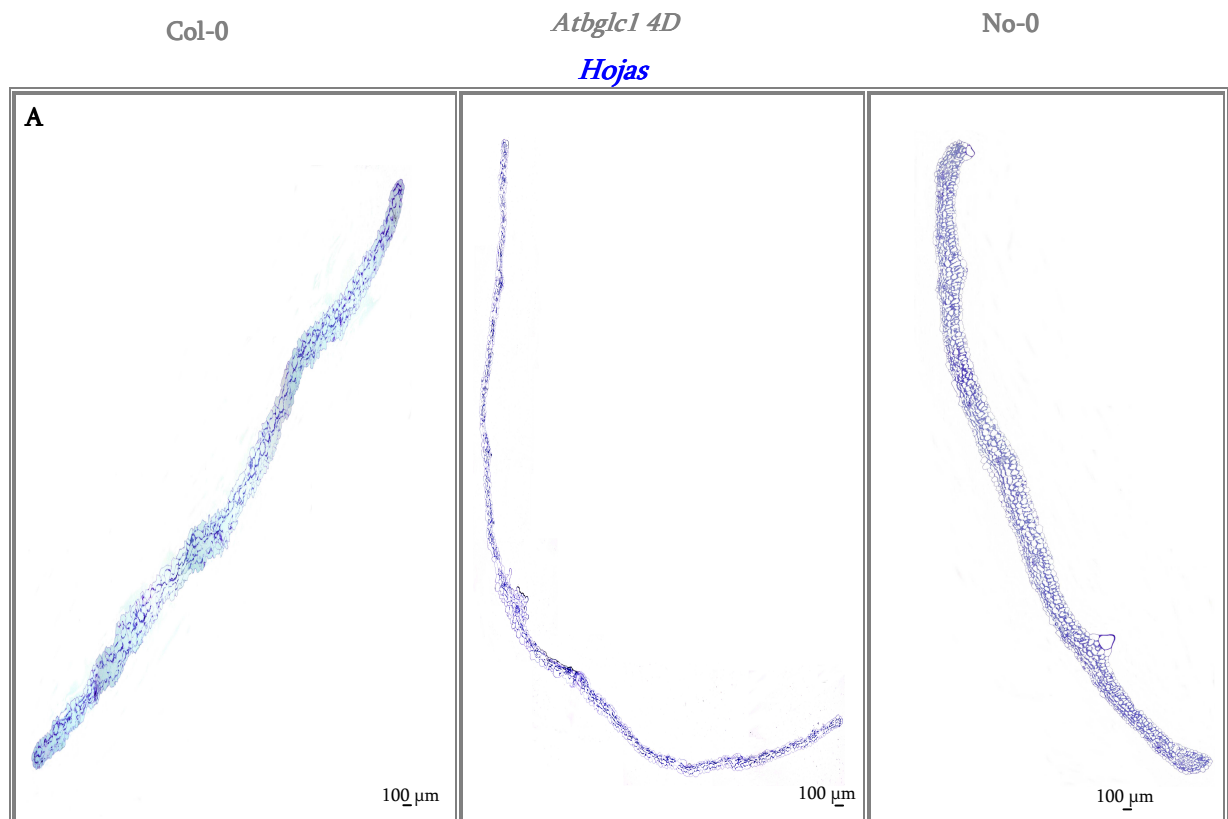
Se realizaron cortes histológicos teñidos con azul de toluidina para determinar la morfología celular de diferentes regiones de plantas correspondientes al mutante *Atbglc1*

*4D* (Savaldi-Goldstein y col., 2007). La característica más importante a nivel morfológico que se observa es el tamaño de las plantas, ya que las correspondientes al mutante *4D* presentan un tamaño global superior a Columbia-0 y Nossen-0, como ya se comentó previamente en este trabajo. Se realizaron cortes histológicos para determinar la morfología de diferentes partes de la planta (hojas, tallo, raíces y silicuas).

En el mutante *4D*, que presenta unas hojas de gran tamaño tanto en ancho como en largo, se estudió en detalle la morfología de dichas hojas a partir de cortes histológicos de las mismas. Se observan diferencias morfológicas claras entre las hojas de 21 días del primer par (maduras) y del cuarto par (jóvenes) en cuanto a nivel de desarrollo, lo que es obvio. Si observamos la figura III.11, el tamaño de la hoja del primer par es mucho mayor en el mutante *Atbglc1 4D* si lo comparamos con ambos silvestres (Col-0 y No-0). Si vemos en detalle las hojas, se puede observar que el número de capas de células en las hojas del mutante *Atbglc1 4D* es superior al de Col-0 y No-0. Además, la disposición de las mismas es diferente en el mutante con respecto tanto a Col-0 como a No-0. Como ya vimos con anterioridad, en la figura III.7 se observa un grado de desarrollo superior en hojas de mutante con respecto a ambos silvestres. Se realizaron cortes de tallo basal y tallo apical de

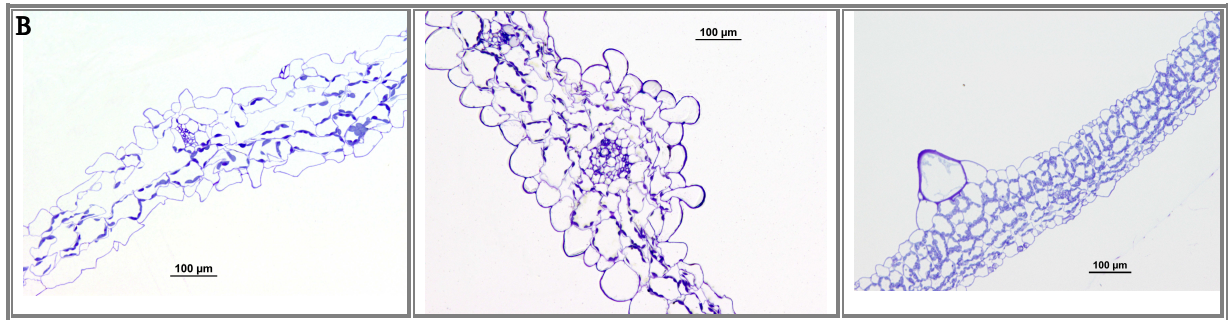
plantas de 30 días, tanto de mutante 4D como de silvestre (Col-0 y No-0). Al igual que en el caso de las hojas se observaron diferencias importantes, ya que alcanzada la misma edad, el nivel de desarrollo en el tallo del mutante *Atbglc1 4D* es superior al que presentan Col-0 y No-0. Los haces vasculares están perfectamente formados en el mutante mientras que en Col-0 y No-0 aparecen en estado de desarrollo en la zona apical. Tanto en el tallo superior de Col-0 y No-0 como en el del mutante se observa una cutícula que lo rodea, sin embargo, en el caso de *Atbglc1 4D* está mucho más desarrollada. A nivel de las diferentes partes del tallo, médula, xilema, floema y epidermis, están completamente desarrolladas en 4D pero no lo están en el caso

de ambos silvestres. Pese a tener la misma edad el crecimiento del mutante es mucho más rápido que el del silvestre (Figura III.11), lo cual corrobora los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento (Figura III.8). En cuanto a silicuas, los cortes histológicos no muestran diferencias estructurales significativas entre Col-0 y el mutante *Atbglc1 4D*. En el caso de la silicua de No-0 la forma externa de la misma es más alargada (Figura III.11). En raíces es donde aparecen mayores diferencias entre Col-0 frente a mutante 4D y No-0, ya que las células del protoxilema (centrales) son de mayor tamaño en Col-0 y presentan una disposición diferente (Figura III.11).

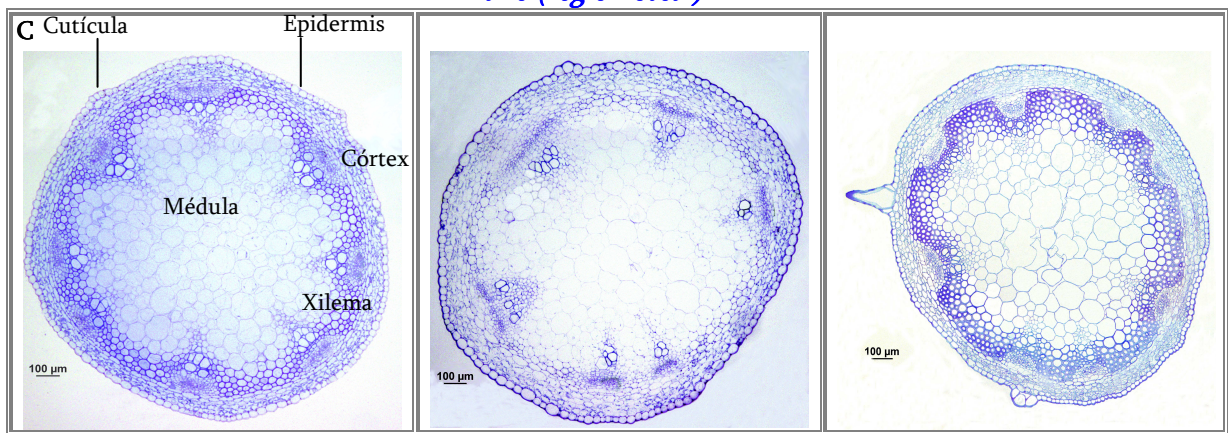




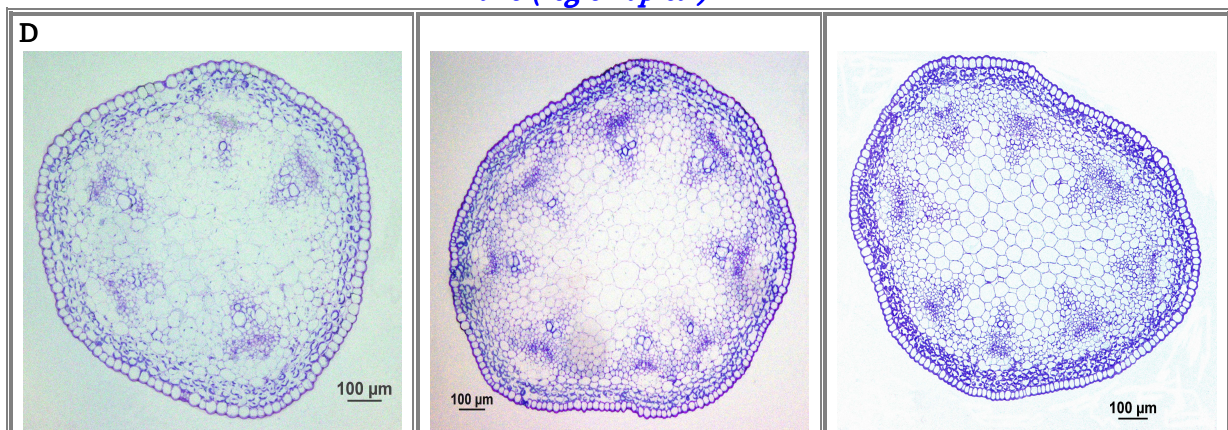
*Detalle de hojas*



*Tallo (región basal)*



*Tallo (región apical)*



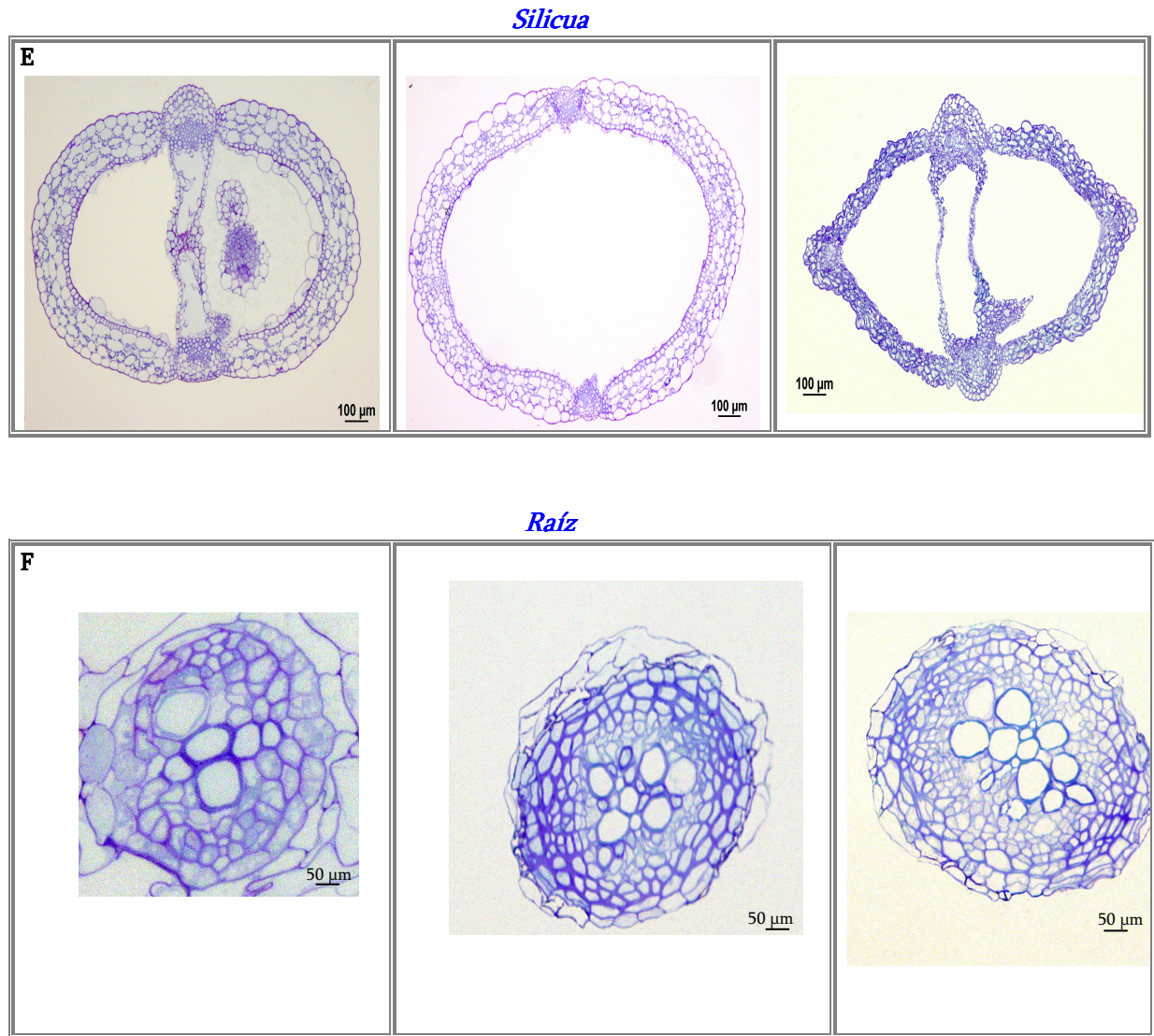


Figura III.11. Cortes histológicos correspondientes a hoja del primer par (primera fila: A), detalle de hoja del primer par (segunda fila: B), tallo región basal (30d) (tercera fila: C), tallo región apical (30d) (cuarta fila: D), silicua (30d) (quinta fila: E) y raíz (30d) (sexta fila: F) de Col-0 (primera columna), mutante *Athglc1 4D* (segunda columna) y No-0 (tercera columna). El tamaño de la barra son 100  $\mu$ m.

El análisis de la actividad de mutantes *knockout* de las  $\beta$ -glucosidasas frente al oligosacárido XXXG, aportó información a cerca de cual de las posibles glucosidasas de *Arabidopsis* es la responsable de dicha actividad. En concreto, el mutante *Atbglc1 4D*, correspondiente al gen *AtBGLC1* que codifica una posible  $\beta$ -glucosidasa, presentaba una ausencia total de actividad frente al oligosacárido GXXG. A fin de estudiar dicho mutante de forma más detallada, se llevó a cabo un análisis mediante PCR a fin de comprobar si la posición del inserto era la correcta y si dicha mutación solo afectaba al gen *AtBGLC1* y no al gen *AtBGLC2*, obteniendo los resultados esperados. A priori, la mutación parece estar sólo en el gen *AtBGLC1*. El análisis fenotípico del mutante *Atbglc1 4D* evidenció el tamaño superior del mismo en relación a Col-0 y No-0 en diferentes órganos de la planta. Además este mutante presenta una mayor velocidad de crecimiento tanto en roseta basal como en raíz con respecto a ambos silvestres. El estudio del mutante 4D se completó con un análisis histológico en el que se puso de manifiesto que el tamaño de las células del mutante *Atbglc1 4D* en hojas es superior al del silvestre. Además la disposición y número de capas de células de mutante en hojas difiere tanto de Col-0 como de No-0. Se llevaron a cabo análisis de expresión de los diferentes genes

que codifican las cuatro posibles glucosidasas en diferentes partes de la planta. Se comprobó que el nivel de expresión del gen *AtBGLC1* parece superior en regiones de la planta en desarrollo.

En base a todos los resultados obtenidos se postula que el gen *AtBGLC1* codifica una  $\beta$ -glucosidasa responsable de dicha actividad en *Arabidopsis thaliana* y por lo tanto implicada en la extensión de la pared celular.



*Capítulo IV:  $\beta$ -galactosidasas de Arabidopsis thaliana*





#### IV.1. Introducción

Las  $\beta$ -galactosidasas son enzimas que hidrolizan residuos terminales  $\beta$ -galactosil de polímeros, oligosacáridos o metabolitos secundarios. Estas enzimas son abundantes en los microorganismos, animales y plantas. Las  $\beta$ -galactosidasas se incluyen dentro de la familia 2 (GH2) y 35 (GH35) de las glicosil hidrolasas (de Alcantara y col., 2006). Las pertenecientes a GH2 aparecen predominantemente en microorganismos, mientras que aproximadamente el 70% de las galactosidasas de la familia GH35 se encuentran en plantas (Jefferson y col., 1987). Se han identificado genes que codifican  $\beta$ -galactosidasas en diferentes especies vegetales. En tomate, por ejemplo, distintas  $\beta$ -galactosidasas, codificadas por diferentes genes, pueden estar implicadas en la modificación de residuos galactosil, actuando sobre diferentes sustratos (Smith y Gross, 2000). Estas se encuentran en diferentes tejidos y actúan frente a diferentes tipos de sustratos. Al igual que las  $\beta$ -glucosidasas, que hemos estudiado en los capítulos anteriores, las  $\beta$ -galactosidasas parecen estar implicadas en la dinámica de la pared celular, que es clave en el crecimiento y desarrollo de la célula vegetal. La galactosa, es un constituyente importante de un número relativamente grande de polisacáridos, fundamentalmente pécticos, arabinogalactano proteínas, pero

también hemicelulósicos, como el xiloglucano (Jarvis, 1984). En plantas, se responsabiliza a las  $\beta$ -galactosidasas de la hidrólisis de los polímeros que contienen galactosa en la pared celular. Estos polímeros que contienen galactosa, son muy activos durante el crecimiento y diferenciación celular. Su importancia radica en sus interacciones y en el papel que puedan jugar durante el crecimiento y desarrollo, mediante la acción de las  $\beta$ -galactosidasas. Por ejemplo, los xiloglucanos (XyGs) almacenados en las semillas no contienen fucosa, pero están mucho más galactosilados (Buckeridge y col., 2000). Los residuos galactosilados de los XyGs desempeñan un papel importante en el control del enlace entre el polímero y la celulosa y en la actividad XET (Van Sandt y col., 2007). Las estructuras tridimensionales de los XyGs sugieren que las cadenas laterales enderezan el esqueleto de glucano para facilitar la formación de enlaces con las microfibrillas de celulosa (Levy y col., 1991; Levy y col., 1997). Los genes *MUR2* y *MUR3* de *Arabidopsis* codifican transferasas específicas de xiloglucano, que transfieren fucosa y galactosa respectivamente (Vanzin y col., 2002; Madson y col., 2003). Mutaciones en estos genes alteran la estructura del XyG, que presenta pérdida de uno o ambos residuos. A partir de la respuesta mecánica de los mutantes *mur2* y *mur3* (Ryden y col., 2003) se dedujo que las

cadenas laterales que contienen galactosa en el xiloglucano contribuyen al mantenimiento de la integridad y resistencia mecánica de la pared celular, mientras que el papel de la fucosa parece relativamente menos importante (Peña y col., 2004).

En garbanzo, por ejemplo, se ha observado que diferentes galactosidasas actúan en distintas etapas del desarrollo o frente a un sustrato determinado sin descartar una posible acción coordinada de las mismas en un momento determinado (Esteban y col., 2003; Esteban y col., 2005). Hay que destacar además que las galactosidasas catalizan reacciones bajo condiciones muy diversas, sobre numerosos sustratos específicos y en diferentes localizaciones, lo que dificulta su estudio (Dey y del Campillo, 1984; Kulikova y col., 1990), ya que pueden jugar papeles muy diferentes en el metabolismo.

Existen numerosos datos acerca de la estructura de las  $\beta$ -galactosidasas de plantas, tales como espárrago (King y Davies, 1995), tomate (Smith y Gross, 2000) y garbanzo (Esteban y col., 2005). De forma general, presentan un dominio C-terminal conservado (100 aa), con unos 7 residuos de cisteína, lo que les aporta capacidad de unión a carbohidratos (Trainotti y col., 2001; Ahn y col., 2007). En tomate, por ejemplo, se considera que el pH óptimo para la actividad galactosidasa está entre 3.0 y 5.0 (Smith y

Gross, 2000). Además el pH óptimo es más alto cuando actúan frente a sustratos de la pared celular que cuando lo hacen sobre sustrato artificial como el *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (Carey y col., 1995).

Concretamente la familia 35 de las glicosil hidrolasas comprende un grupo caracterizado por su capacidad para hidrolizar residuos terminales no reductores de  $\beta$ -galactosa (Henrissat, 1998). Se ha propuesto que el mecanismo de actuación de las  $\beta$ -glicosidasas se basa en que catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico entre dos carbohidratos o entre un carbohidrato (CH) y un no carbohidrato (aglicona) mediante catálisis ácida general (Ahn y col., 2007). La familia 35 de las GH ha sido clasificada por contener la secuencia consenso G-G-P-(LIVM)(2)-x(2)-Q-x-E-N-E-(FY) en el sitio activo, donde los aminoácidos LIVM y FY son sustituciones conservadas, y x es cualquier aminoácido (Henrissat, 1998). Se han encontrado  $\beta$ -galactosidasas en un amplio rango de órganos y tejidos vegetales que sufren cambios durante el desarrollo, como semillas, cotiledones, epicótilos, frutos en maduración, pétalos, polen, etc. Dado que las galactosidasas pueden catalizar la hidrólisis de residuos de galactosa de diversos polímeros (carbohidratos y glicoproteínas) no se conoce con exactitud los sustratos sobre los que actúan de forma natural.

Sólo se han identificado los sustratos sobre los que actúan algunas  $\beta$ -galactosidasas de diferentes especies. Así, en *Tropaeolum majus* L., (Edwards y col., 1988) se purificó una  $\beta$ -galactosidasa con actividad sobre xiloglucano, para la cual se demostró una correlación entre la disminución del xiloglucano y la actividad *in vitro* de dicha galactosidasa. Esta  $\beta$ -galactosidasa fue posteriormente clonada (ref.: <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=1996007743&IA=WO1996007743&DISPLAY=DOCS>). Otra  $\beta$ -galactosidasa identificada pertenece a *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) que actúa sobre oligosacáridos de xiloglucano, pero no sobre el polímero (de Alcantara y col., 2006). Trabajos recientes en *Arabidopsis thaliana*, posteriores a este trabajo, sugieren que algunas  $\beta$ -galactosidasas (AtBGAL2, AtBGAL4 y AtBGAL5) están fuertemente unidas a la pared celular y actúan sobre polisacáridos pécticos (Gantulga y col., 2008). De hecho, entre las funciones más importantes de las galactosidasas en relación con el crecimiento vegetal está la modificación de polisacáridos pécticos (Masuda y col., 1985;

Konno y col., 1986; Dopico y col., 1990) y la rotura de enlaces polisacáridicos durante el desensamblaje de la pared (Keegstra y Albersheim, 1970; Murray y Bandurski, 1975). En este capítulo estudiaremos posibles  $\beta$ -galactosidasas de *Arabidopsis thaliana*. De las galactosidasas pertenecientes a la familia 35 de las glicosil hidrolasas hemos seleccionado doce que están codificadas por los siguientes genes: AtBGAL2 (At3g52840), AtBGAL4 (At5g56870), AtBGAL12 (At4g26140), AtBGAL1 (At3g13750), AtBGAL10 (At5g63810), AtBGAL15 (At1g31740), AtBGAL8 (At2g28470), AtBGAL9 (At2g32810), AtBGAL6 (At5g63800), AtBGAL16 (At1g77410), AtBGAL13 (At2g16730) y AtBGAL 17 (At1g72990) y dentro de las cuales intentaremos determinar cual o cuales presentan alteraciones en la estructura de su xiloglucano. Seleccionaremos aquellas que, a priori, puedan actuar sobre el xiloglucano y/o sus oligosacáridos y por lo tanto que jueguen un papel importante en la extensión de la pared celular.

## IV.2. Materiales y Métodos

### IV.2.1. Árbol filogenético de las $\beta$ -galactosidasas

Se realizó un árbol filogenético con las posibles  $\beta$ -galactosidasas de *Arabidopsis thaliana* pertenecientes a la familia 35 de las glicosil hidrolasas. Las secuencias de las galactosidasas se buscaron en la base de datos CAZY (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) y se obtuvieron sus secuencias de GenBank. Los alineamientos de secuencias se realizaron con el ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)) usando el método de Neighbor-joining con el programa Mega 3.1 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)). Para la predicción del destino celular de las galactosidasas objeto de estudio se utilizó el programa PSORT ([psort.nibb.ac.jp](http://psort.nibb.ac.jp)).

Para buscar secuencias homólogas se empleó el programa NCBI BLAST 2.0 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)).

Los alineamientos de secuencias nucleotídicas se realizaron con el programa MULTALIN ([bioinfo.genopole.toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html](http://bioinfo.genopole.toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html)).

### IV.2.2. Material Vegetal

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) ecotipo Columbia 0 como control. Se crecieron en cámara a 25°C con un fotoperíodo de 16:8 luz/oscuridad, en sustrato tierra vegetal:vermiculita (3:1). Se utilizó, como ya se explicó en capítulos anteriores el sistema de crecimiento ARASYSTEM ([www.arasystem.com](http://www.arasystem.com)).

También se emplearon como material vegetal mutantes *knockout* correspondientes a cada una de las posibles  $\beta$ -galactosidasas de *Arabidopsis thaliana*, obtenidos de colecciones públicas. Los mutantes correspondientes a los genes *AtBGAL16* y *AtBGAL17* fueron obtenidos del INRA (Versailles) ([www.versailles.inra.fr/](http://www.versailles.inra.fr/)). Esta colección de mutantes se inició en 1992 y usa para la transformación la infiltración a vacío del vector pGKB5 (Bouchez y col., 1993) de *Agrobacterium tumefaciens* (Bechtold y col., 1993). Dicha transformación se lleva a cabo sobre el ecotipo Wassilevskija. El vector pGKB5 contiene el gen GUS y además aporta a las plantas transformadas resistencia a kanamicina y BASTA, (fig. IV.1) lo que nos permite seleccionarlas. Las semillas que se distribuyen pertenecen a la generación T2.

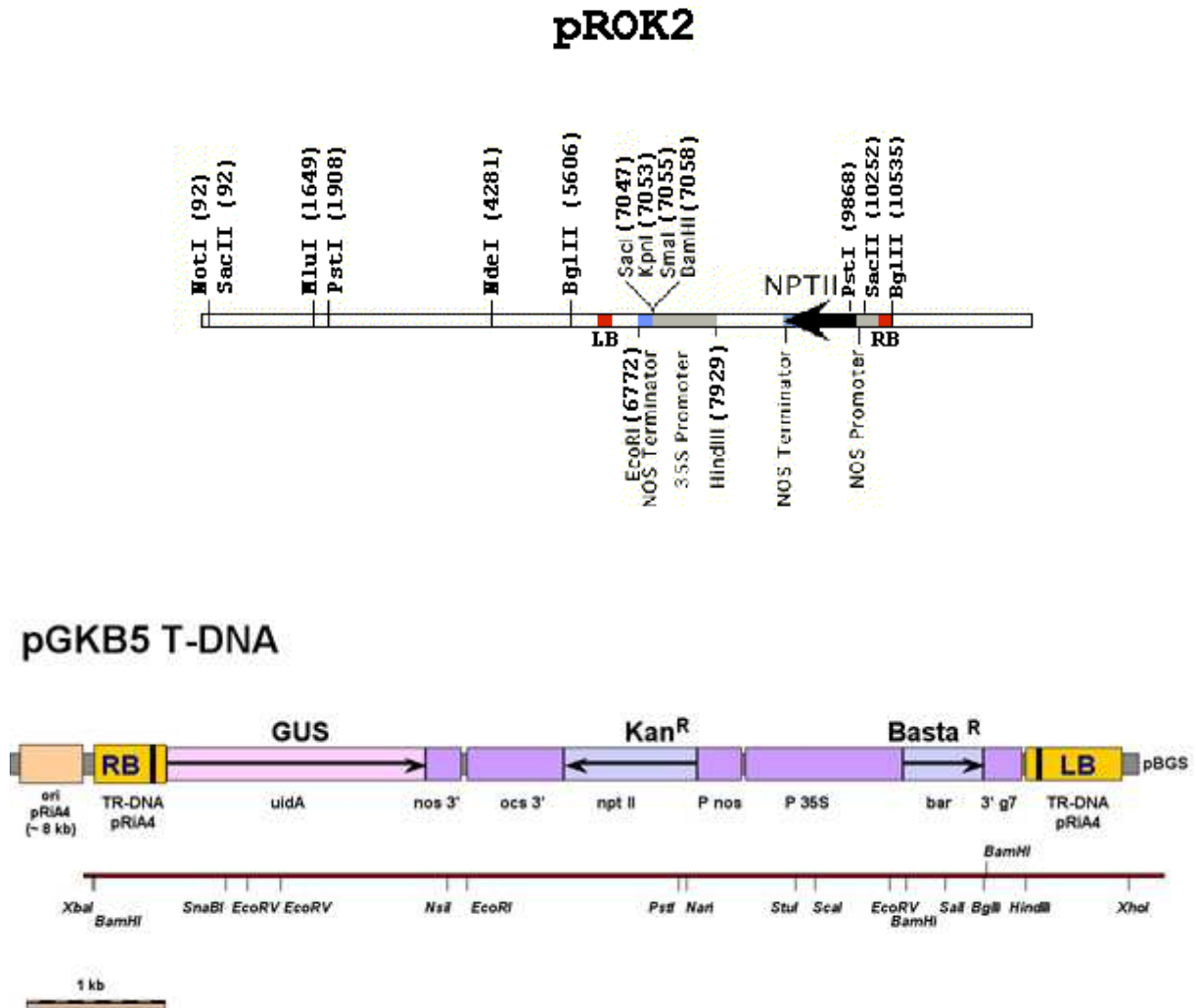


Figura IV.1. Vectores pROK 2 (mutantes del SALK) que presenta el gen de resistencia a kanamicina, y el vector pGKB5 correspondiente a las líneas obtenidas del INRA, que confiere resistencia a BASTA, a kanamicina y que porta el gen GUS, que permite localizar el lugar de inserción así como sus niveles de expresión. La estructura de los vectores pDAP 101 y pCSA 110, aparecen en materiales y métodos de capítulo II, apartado II.2.1.

Del instituto RIKEN (RIKEN Bioresource Center) se obtuvo el mutante del gen *AtBGAL13*, obtenido por inserción de un transposón en el gen correspondiente. Los mutantes se obtienen a partir de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Nössen (Fedoroff y Smith, 1993). El lugar de inserción se determina por homología BLASTN con el ecotipo Columbia. La línea mutada tiene el código 12-4162-1 y se

selecciona en base a su resistencia a la higromicina.

Del SAIL (Syngenta *Arabidopsis* Insertion Library) se obtuvieron otras de las líneas mutantes correspondientes a varios genes que codifican posibles  $\beta$ -galactosidasas de *Arabidopsis thaliana*. Los mutantes del SAIL se originan mediante infiltración al vacío de un fragmento de T-DNA. Esta infiltración se lleva

a cabo sobre plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0, con los vectores de *Agrobacterium tumefaciens*, pDAP 101 en el caso de los genes *AtBGAL6* y *AtBGAL12* y el vector pCSA110 en el caso de los genes *AtBGAL15*, *AtBGAL1* y *AtBGAL10*. Los mutantes procedentes del SAIL presentan resistencia al herbicida BASTA (Glufosinato de amonio) que nos permite identificar los individuos portadores de la inserción. Para amplificar los fragmentos que flanquean el borde izquierdo de de la inserción de T-DNA se utiliza la TAIL-PCR.

Finalmente, del SALK (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory), se obtuvieron las líneas mutantes de los genes *AtBGAL13*, *AtBGAL8*, *AtBGAL9*, *AtBGAL2* y *AtBGAL4*. Estos mutantes se obtienen mediante infiltración al vacío de un vector en plantas con ecotipo Columbia 0. El vector empleado en dicha infiltración es el pROK2 (fig. IV.1) de *Agrobacterium tumefaciens*, que aporta resistencia a kanamicina. Las semillas procedentes del SALK corresponden a una generación T3 o T4.

Locus	Nombre gen	Colección	Código	Ecotipo	Resistencia
AtBGAL16	<i>AtBGAL16</i>	INRA	RAFL_206H02	Wassilevskija	Kan y BASTA
AtBGAL17	<i>AtBGAL17</i>	INRA	RAFL_571B12	Wassilevskija	Kan y BASTA
AtBGAL13	<i>AtBGAL13</i>	RIKEN	12-4162-1	Nössen	Higromicina
AtBGAL6	<i>AtBGAL6</i>	SAIL	CS814422	Columbia	BASTA
AtBGAL12	<i>AtBGAL12</i>	SAIL	CS831611	Columbia	BASTA
AtBGAL15	<i>AtBGAL15</i>	SAIL	CS814987	Columbia	BASTA
AtBGAL1	<i>AtBGAL1</i>	SAIL	CS814485	Columbia	BASTA
AtBGAL10	<i>AtBGAL10</i>	SAIL	CS832850	Columbia	BASTA
AtBGAL8	<i>AtBGAL8</i>	SALK	N634141	Columbia	Kanamicina
AtBGAL9	<i>AtBGAL9</i>	SALK	N556526	Columbia	Kanamicina
AtBGAL2	<i>AtBGAL2</i>	SALK	N522121	Columbia	Kanamicina
AtBGAL4	<i>AtBGAL4</i>	SALK	N593071	Columbia	Kanamicina

Tabla IV.1. Tabla resumen de los mutantes procedentes de diferentes colecciones públicas, que han sido utilizados en este trabajo.

La selección de los mutantes resistentes a kanamicina e higromicina se realizó en placas de medio MS para *Arabidopsis*, con agar al 1% y suplementadas con el antibiótico correspondiente. En el caso de la kanamicina se añadió a las placas 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y para las placas de higromicina 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Las semillas de mutantes resistentes a BASTA, se sembraron directamente en tierra y se rociaron con el herbicida cada 3 días durante un período de 10 días aproximadamente, una vez que las plantas alcanzan una semana de crecimiento.

#### IV.2.3. PCR-Semicuantitativa en Tiempo Real

Para la extracción del RNA total, partimos de hojas maduras (primer par) y hojas jóvenes (cuarto par), como se explicó en capítulos anteriores, de plantas de 21 días, y de silicuas, segmentos de tallo y ápice floral de plantas de 4 semanas. Se utilizaron entre 50 y 100 mg de

material vegetal de donde se extrajo RNA utilizando el RNeasy Plant Mini Kit de Quigen. Este RNA se cuantificó mediante espectrofotometría y se trató con el kit RNase-Free Dnase de Promega, a fin de evitar posibles contaminaciones con DNA. Para obtener el cDNA se utilizó el 1st Strand Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) de Roche siguiendo las instrucciones del fabricante y partiendo de 1  $\mu\text{g}$  de RNA total.

Al igual que en el capítulo II, se utilizó como gen de expresión constitutiva, la  $\beta$ -tubulina (*At5g23860*). Para llevar a cabo la PCR se diseñaron cebadores sobre el cDNA, que amplifican fragmentos de entre 150 y 300 pb. Las condiciones en que se realizó la PCR son las recomendadas por el fabricante de la polimerasa con SYBR® green de Applied Biosystems que utilizamos. En la tabla IV.2 se muestran los cebadores diseñados para cada una de las posibles  $\beta$ -galactosidasas.

Nombre Locus	Secuencia de nucleótidos
AtBGAL6-1	5' CCTGCTGGACAACCTTCTCAATCTATAT 3'
AtBGAL6-2	5' GAATTGAGATTGAGCTTGACTCGAACC 3'
AtBGAL16-1	5' GAAGAAGGCGAACCTATGCGCTG 3'
AtBGAL16-2	5' TTCCTTGTCTCGTGTGTATTGTGCA 3'
AtBGAL13-1	5' TGGAGCTCTCTCAAGCGATGACAA 3'
AtBGAL13-2	5' CCTGCTCAGGCTCATGAACGTTT 3'
AtBGAL1-1	5' GAATGGCAATCAACGCTGGTGAAC 3'
AtBGAL1-2	5' GTGCTACAGTTACAGAACCAGTTCTGC 3'



AtBGAL12-1	5' CTGAATGGAGTTAACTCCGGAACATGG 3'
AtBGAL12-2	5' GGTGGTCATGATTCATTGATTCCTCTG 3'
AtBGAL4-1	5' GCTACACCAGCAGGAAATGAACCAT 3'
AtBGAL4-2	5' GAGATTCGGTTAGGATCACCACCTAACTC 3'
AtBGAL2-1	5' TGATACACCGAGAGGCAACGAACC 3'
AtBGAL2-2	5' CAAGAGAGATTCCACTTGGATCACCACC 3'
AtBGAL10-1	5' GCGTCTACGGCGATACTGGTGG 3'
AtBGAL10-2	5' CAGGAGATGGCTCATGGCCATTC 3'
AtBGAL8-1	5' AACAGAACCAGGCCGGTTC 3'
AtBGAL8-2	5' GAAGCTTCAACAGCTAAGCTCTTGACGAC 3'
AtBGAL9-1	5' GCGGATACTGTCACTGATCATCG 3'
AtBGAL9-2	5' GCGATGAGATCAGACCACATCTCAGG 3'
AtBGAL15-1	5' TCAGACATAGATGGAGACAACACCTTGG 3'
AtBGAL15-2	5' AGCTTCGACGGCGAGTCTCTTAGC 3'
AtBGAL17-1	5' AAGACACATATCTATCATTCAACGGTTGG 3'
AtBGAL17-2	5' CATGTGAAGTCTTGGTGATCCACTGC 3'
Tubulina_At5g23860_E	5'-CGTGGATCACAGCAATACAGAGCCGTACGGTCATCATCTGACAC-3'
Tubulina_At5g23860_D	5'-CCTCCTGCACTTCCACTTCGTCTTCGCGTGAGTATTACGAAGGTG-3'

Tabla IV.2. Cebadores utilizados en la amplificación de las regiones genómicas de las  $\beta$ -galactosidasas objeto de estudio.

#### IV.2.4. Obtención de extracto apoplástico

El método que se siguió para la extracción de apoplasto es el de *Monroe y col.* (Monroe y col., 1999) adaptado para *Arabidopsis* por Sampedro y col. (Sampedro y col., 2001), como ya se describió en capítulos previos. El extracto apoplástico una vez obtenido se dializó en Amicon Stirred Cell 8010 (Millipore) con una membrana YM10 (Millipore) frente a tampón ácido acético: piridina: agua en relación 1:1: 98 (v/v/v) y pH 4,5, hasta 3 ml. Posteriormente se

concentró en Amicon Centricón YM-10 (Millipore) hasta obtener un volumen final de 200  $\mu$ l.

#### IV.2.5. Preparación de sustratos: XLLG y XLFG

Para la obtención del oligosacárido XLFG, se partió de los entrenudos de plantas de guisante crecidas en cámara a 25°C durante aproximadamente 3 semanas. El material se fijó en metanol y se procedió a su

homogenizado, tras el cual se obtuvo el residuo insoluble en alcohol (AIR). Este AIR se dializó frente a agua destilada a 4°C durante 2 días y se liofilizó. El xiloglucano se extrajo del AIR con KOH al 24%, a temperatura ambiente y con agitación magnética durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se centrifugó la suspensión a 3500 g dos veces y se consideró el sobrenadante como fracción hemicelulósica. Tras neutralizarla con ácido acético esta fracción se dializó a 4°C frente a agua durante dos días.

Un g de hemicelulosa liofilizada se resuspendió en 100 ml de tampón acético piridina 50 mM pH 4,7, se pasó unos minutos por un sonicador y se añadieron 100 mg de endoglucanasa de *Trichoderma viride* (EC 3.2.1.4) (www.sigmaldrich.com). Se incubó durante toda la noche a 25°C con agitación magnética. Se utilizó thimerosal al 0,01% (w/v) como antibiótico para prevenir la contaminación bacteriana. A continuación se centrifugó a 6000 g durante 20 min, se recogió el sobrenadante y se liofilizó. Parte de este liofilizado, 200 mg, se resuspendió en acético piridina 50 mM pH 4,7 y se sometió a cromatografía de exclusión molecular en columna de Bio Gel P-2 (41 x 3 cm) utilizando azul de dextrano y glucosa como marcadores externos. Las fracciones de 4 ml fueron eluidas en el mismo tampón. Para conocer el contenido total de azúcares en las fracciones se

utilizó el método del fenol-sulfúrico (Dubois y col., 1956) utilizando glucosa como patrón.

Las primeras fracciones del pico de azúcares recogidas se sometieron a análisis mediante MALDI-TOF y se comprobó que estaban constituidas fundamentalmente por el oligosacárido XLFG con pequeñas cantidades de XXFG.

En el caso del nonasacárido, XLLG, se obtuvo del TCI Europe Tokio (www.tcieurope.eu) con un 95% de pureza.

#### IV.2.6. Análisis de paredes celulares de hojas

Se utilizaron hojas de la roseta basal de plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 y de los diferentes mutantes *knockout* de las  $\beta$ -galactosidasas en estudio, de plantas de 21 días. Se fijaron en metanol hirviendo (x3), se lavaron con metanol:cloroformo (1:1) (v:v) (x4) y se secaron en éter etílico. El residuo seco y homogenizado, se consideró pared celular. A continuación se resuspendió en 1 ml de tampón acético piridina 10 mM a pH 7,2 y se incubó con 5  $\mu$ l de endocelulasa (EG II) de Megazyme durante toda la noche. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó para eliminar los residuos no digeridos, y 400  $\mu$ l de sobrenadante se filtraron con UltraFree MC de 0,45  $\mu$ m de Millipore con Q-Sepharose Fast Flow. Se secaron en Speedvac y finalmente se resuspendieron en 10  $\mu$ l de agua. Los

oligosacáridos de xiloglucano liberados tras la incubación se analizaron mediante MALDI-TOF.

#### IV.2.7. Análisis de oligosacáridos mediante MALDI-TOF

Al igual que en el caso de las  $\beta$ -glucosidasas, en el caso de  $\beta$ -galactosidasas se realizó el análisis del mismo modo. Para medir la actividad  $\beta$ -galactosidasa *in vivo* frente a oligosacáridos de xiloglucano, se partió de 20  $\mu$ l de extracto apoplástico y se incubó con 10  $\mu$ l del oligosacárido correspondiente. La reacción se llevó a cabo a 30 °C durante 14 horas. Tras la incubación, se separó una alícuota de 2  $\mu$ l que se mezcló con el mismo volumen de matriz DHB (Iglesias y col., 2006). De la mezcla se cargó en placa Bruker de MALDI-TOF MS 1  $\mu$ l y se secó a vacío. Finalmente las muestras fueron analizadas en el espectrómetro de masas Bruker Autoflex MALDI-TOF utilizando Peptide Calibration Standard como referencia para el calibrado. También se analizó mediante MALDI-TOF la composición de las paredes celulares de los diferentes mutantes *knockout*, correspondientes a las 12  $\beta$ -galactosidasas en estudio. Para ello se partió de una alícuota de 2  $\mu$ l del medio de reacción correspondiente obtenido tras el tratamiento de las paredes celulares de hojas con endocelulasa, mezclado

con el mismo volumen de matriz DHB, y se cargó 1  $\mu$ l de la mezcla en placa Bruker.

#### IV.2.8. Análisis de componentes principales

Una vez obtenidos los espectros de masas correspondientes a plantas individuales de los diferentes mutantes correspondientes a las doce posibles  $\beta$ -galactosidasas, se utilizó el programa Win-Das (Kemsley 1998). Este programa, nos permite comparar la composición del xiloglucano de las paredes de los diferentes mutantes *knockout* con Columbia 0, a fin de seleccionar aquellos cuyo xiloglucano presenta mayores diferencias con el silvestre.

#### IV.2.9. Análisis de la actividad $\beta$ -galactosidasa de los mutantes

El material empleado fueron plantas mutantes obtenidas de semillas procedentes de diferentes colecciones públicas. Por esta razón los mutantes presentan resistencia a diferentes agentes de selección (higromicina, kanamicina, BASTA). Las plantas utilizadas se corresponden al menos con una generación T3, que presenta un 100% de resistencia al agente correspondiente. Como ya se explicó previamente, unos mutantes fueron seleccionados mediante siembra en placa de medio MS, agar al 1% y suplementada con el antibiótico correspondiente. Otras plantas mutantes fueron seleccionadas mediante

siembra en tierra, crecimiento en fitotrón con un fotoperíodo de 16:8 (luz/oscuridad) y 25 °C. Estas plantas fueron rociadas con BASTA como se explicó previamente.

Para determinar la actividad  $\beta$ -galactosidasa se obtuvo el extracto apoplástico de los diferentes mutantes de la tabla IV.3. La obtención de dicho apoplasto se llevó a cabo

según lo explicado en el capítulo II, apartado II.2.6. Se partió de 200 mg de semillas de mutante y se obtuvieron finalmente 200  $\mu$ l de apoplasto concentrado. El apoplasto obtenido se incubó finalmente con los oligosacáridos XLFG y/o XLLG y se analizaron los productos resultantes de la digestión.

Gen mutado	Individuo mutante seleccionado
<i>AtBGAL6</i>	2G
<i>AtBGAL10</i>	2B
<i>AtBGAL15</i>	3G 6A 6F
<i>AtBGAL12</i>	4F 5F 6C
<i>AtBGAL8</i>	1A

Tabla IV.3. Algunos de los mutantes de  $\beta$ -galactosidasa seleccionados, estos individuos se corresponden con una generación T3.

Para analizar la actividad  $\beta$ -galactosidasa frente a los oligosacáridos mencionados, se siguió el protocolo explicado en el capítulo II, apartado II.2.11, mezclando 20  $\mu$ l de extracto apoplástico obtenido de los diferentes mutantes con 10  $\mu$ l del oligosacárido correspondiente XLFG y/o XLLG (1  $\mu$ g/  $\mu$ l). La reacción se incubó durante 14 h. Finalmente se separa una alícuota de 2  $\mu$ l que se analiza mediante MALDI-TOF.

#### IV.2.10. Análisis fenotípico de los mutantes seleccionados

Al igual que se hizo con algunos de los mutantes de las glucosidasas, en el caso de las  $\beta$ -galactosidasas también se llevó a cabo una cinética de crecimiento de la roseta basal, de aquellos mutantes que con anterioridad se habían analizado mediante MALDI-TOF. Como se explicó previamente, para llevar a cabo la medida de la roseta basal, se esperó a que el primer par de hojas verdaderas alcanzara un tamaño adecuado y se procedió a

la toma de fotografías en días consecutivos. Las medidas de las plantas se realizaron con el programa Scion Image, previamente calibrado. Se tomaron además fotos de plantas mutantes individuales que presentaban alguna diferencia significativa con respecto al silvestre.

#### **IV.2.11. Análisis bioinformático de expresión de las diferentes $\beta$ -galactosidasas**

Se llevó a cabo un análisis informático de los niveles y regiones de expresión de las diferentes  $\beta$ -galactosidasas en estudio. Los resultados se obtienen analizando las bases de datos de microarrays. El estudio de los

microarrays, se ha convertido en un aspecto importante en cualquier investigación. Para facilitar la interpretación y el análisis de los datos, hay una herramienta que se llama eFPBrowser. Esta herramienta está disponible en [www.bar.utoronto.ca/](http://www.bar.utoronto.ca/) y para explorar los diferentes datos de microarray utiliza diferentes colores que indican el grado de expresión de un gen determinado en una parte concreta de la planta. Se puede obtener un mapa de desarrollo con el grado de expresión, relativa o absoluta de un gen, o bien, comparada con otro gen.

### IV.3. Resultados y discusión

#### IV.3.1. $\beta$ -Galactosidasas de la familia 35 de las glicosil hidrolasas de *Arabidopsis thaliana*

Como se mencionó al inicio de este capítulo, el 70% de las  $\beta$ -galactosidasas de la familia 35 de las glicosil hidrolasas se encuentran en plantas (Ahn y col., 2007). Se realizó un árbol filogenético en el que se incluyeron las doce  $\beta$ -galactosidasas de *Arabidopsis thaliana* que presentan alta probabilidad de dirigirse al apoplasto por la ruta secretora. Para saber el destino más probable de las proteínas codificadas por los genes correspondientes se utilizó el programa PSORT Prediction (Nakai y Kanehisa, 1992). Este programa nos da la probabilidad con la

que cada una de las proteínas alcanzará un determinado destino en la célula. Sólo si dicha probabilidad es alta se selecciona una determinada proteína para su estudio posterior. El árbol filogenético se construyó con el programa MEGA 3.1 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Kumar y Kumar, 2001) que permite realizar análisis moleculares relacionados con la filogenia a partir de las secuencias aminoacídicas o nucleotídicas. Utilizando el método de matriz de distancia UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*) (Sneath y Sokal, 1973) y las secuencias proteicas de las  $\beta$ -galactosidasas, se obtuvo el árbol filogenético que se muestra en la figura IV.2.

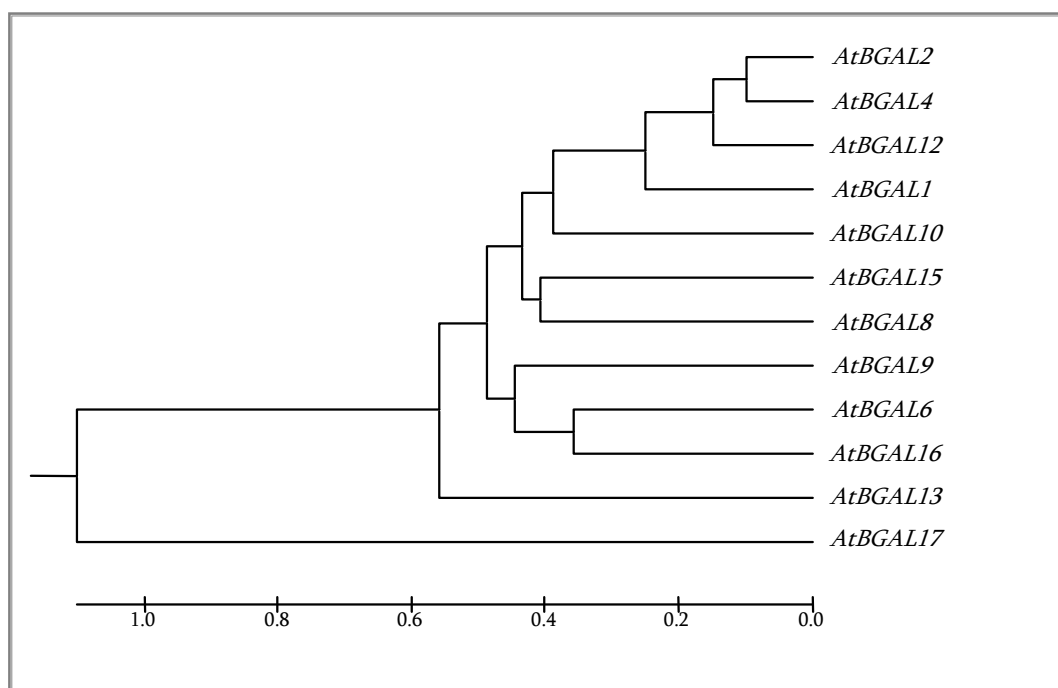


Figura IV.2. Árbol filogenético de las  $\beta$ -galactosidasas de *Arabidopsis thaliana* pertenecientes a la familia 35 de las glicosil hidrolasas.

Las posibles  $\beta$ -galactosidasas se encuentran en diferentes cromosomas de los cinco que componen el genoma de *Arabidopsis*. Así, en los cromosomas 1, 2 y 5 están tres genes en cada uno, totalizando nueve de los doce. En el cromosoma 3 hay dos genes que codifican las  $\beta$ -galactosidasas y en el cromosoma 4 hay uno. El péptido señal, obtenido a partir del punto de corte, de las proteínas codificadas por los genes de las galactosidasas de obtuvo de [www.cbs.dtu.dk/services/SignalP](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP), y en todos los casos las dirige hacia el apoplasto.

#### IV.3.2. Análisis bioinformático de expresión de las $\beta$ -galactosidasas de *Arabidopsis thaliana*

Para cada uno de los genes de las  $\beta$ -galactosidasas en estudio se llevó a cabo un análisis de expresión en relación con los diferentes órganos de la planta, a fin de determinar dónde se expresan mayoritariamente dichos genes. Los resultados se obtuvieron mediante el análisis de los microarrays, que nos facilitan la interpretación de los datos disponibles para cada uno de los genes analizados. El grado de expresión de los diferentes genes en las distintas partes de la planta se representa mediante diferentes colores. El azul corresponde al nivel mínimo de expresión, mientras que el rojo se corresponde con el nivel máximo (Fig. IV.3).

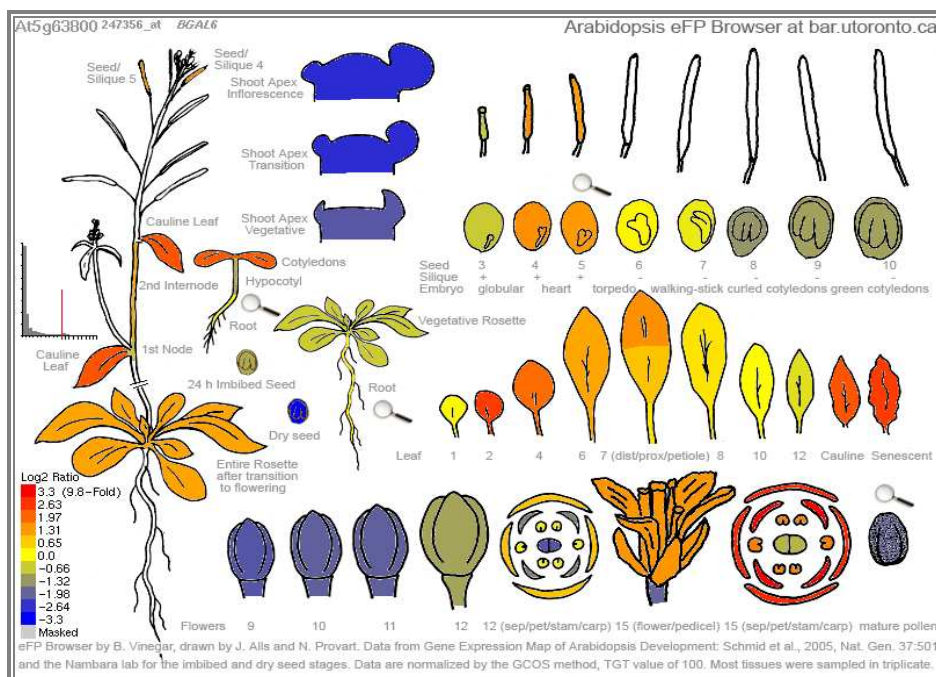


Figura IV.3. Se muestran los resultados de análisis de los datos de microarrays. En este caso la imagen corresponde a los resultados obtenidos para el gen *AtBGAL6*. El análisis se llevó a cabo para las doce  $\beta$ -galactosidasas de *Arabidopsis thaliana*. (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>)

En el caso del gen *AtBGAL2* presenta mayor expresión en hojas de roseta basal tallo basal y cotiledones, mientras que no se expresa en polen y semillas. *AtBGAL4* presenta un nivel de expresión relativamente alto en tallo basal, silicua joven, polen y raíz y no hay expresión en semillas. La expresión de *AtBGAL12* es máxima en flor en desarrollo, y mínima o nula en hoja senescente y silicua joven mientras que la de *AtBGAL1* es muy baja en toda la planta y no se expresa en polen y semillas. *AtBGAL10* presenta una elevada expresión en hoja en desarrollo y en un nivel muy bajo en hoja senescente, silicua madura y polen. *AtBGAL15* tiene su expresión máxima en silicua madura y polen. *AtBGAL8* presenta una mayor expresión en estadios iniciales de desarrollo de flores y nula en hoja senescente y polen.

*AtBGAL9* tiene una expresión muy alta en tallo basal, hojas de la parte superior del tallo, hoja senescente y cotiledones y no se expresa en flor en estadios iniciales de desarrollo. *AtBGAL6* tiene una expresión muy alta en hojas de la parte apical del tallo, roseta basal y tallo basal, es máxima en hoja senescente y cotiledones, y no se expresa en flores en desarrollo, polen y semillas. *AtBGAL16* se expresa de forma muy elevada en flores en desarrollo y su expresión es máxima en polen, mientras que se expresa de forma muy baja en hoja senescente y tallo basal. *AtBGAL13* se expresa en un nivel muy alto en polen, y en menor grado en flor en desarrollo. *AtBGAL17* alcanza su máxima expresión en tallo basal y se expresa muy poco en roseta basal. Estos resultados aparecen resumidos en la tabla IV.4.



	Regiones de expresión del gen en la planta	
	Mayor o Máxima	Mínima o nula
<b><i>AtBGAL1</i></b>	Tallo apical Cotiledones	Polen Semillas
<b><i>AtBGAL2</i></b>	Roseta basal Tallo basal Cotiledones	Semillas
<b><i>AtBGAL4</i></b>	Tallo basal Silicua joven Polen Raíz	Semillas
<b><i>AtBGAL6</i></b>	Roseta basal Hojas región apical del tallo Hoja senescente Tallo basal Cotiledones	Flores en desarrollo Polen Semillas
<b><i>AtBGAL8</i></b>	Flor en desarrollo	Hoja senescente Polen
<b><i>AtBGAL9</i></b>	Hojas región apical del tallo Tallo basal Hoja senescente Cotiledones	Flor en desarrollo
<b><i>AtBGAL10</i></b>	Flor en desarrollo	Hoja senescente Silicua madura Semilla Polen
<b><i>AtBGAL12</i></b>	Flor en desarrollo	Hoja senescente Silicua joven
<b><i>AtBGAL13</i></b>	Polen	Flores en desarrollo
<b><i>AtBGAL15</i></b>	Silicua madura Polen	Tallo basal
<b><i>AtBGAL16</i></b>	Flor en desarrollo Polen	Hoja senescente Tallo basal
<b><i>AtBGAL17</i></b>	Tallo basal	Roseta basal

Tabla IV.4. En la tabla se muestran los resultados obtenidos a partir del análisis de los datos de microarrays para las doce  $\beta$ -galactosidasas en estudio en este capítulo (<http://bar.utoronto.ca/>).

Algunas de las galactosidasas en estudio se expresan en órganos de la planta que se encuentran en desarrollo, lo cual contribuye a pensar que pueda tratarse de galactosidasas que actúen sobre el xiloglucano y/o sus oligosacáridos. De hecho, otras galactosidasas

actúan sobre pectinas (Gantulga y col., 2008). Durante el crecimiento la pared celular se relaja y bajo la presión de turgencia se expande, para ello es necesario que las enzimas que actúan sobre ella originen dicha relajación. Si fuesen alguna de estas  $\beta$ -

galactosidasas las que actúan sobre xiloglucano estarían implicadas en el crecimiento de la pared celular y por lo tanto de la planta al contribuir al debilitamiento de la pared (Peña y col., 2004).

#### IV.3.3. PCR semi-cuantitativa en tiempo real

Se estudiaron los niveles de expresión de los doce genes que codifican las posibles  $\beta$ -galactosidasas del xiloglucano en *Arabidopsis thaliana* mediante PCR semi-cuantitativa en tiempo real. Dicha expresión se estudió en diferentes partes de la planta que presentaban distinto grado de desarrollo. Esta técnica nos permite conocer la expresión de los genes en estudio de forma prácticamente inmediata, mediante la amplificación de una región correspondiente a cada uno de ellos. Para cada gen, la región amplificada fue de unas 150-250 pb aproximadamente. Los cebadores se diseñaron sobre cDNA y fueron analizados con diferentes programas informáticos para comprobar que eran específicos de cada galactosidasa, a fin de evitar amplificaciones inespecíficas.

En el caso de las hojas y el tallo, presentan diferente grado de desarrollo, ya que mientras el primer par y el tallo inferior, prácticamente

han dejado de crecer, las hojas del cuarto par y el tallo inferior presentan su mayor tasa de crecimiento.

En el caso de hojas, partiendo de plantas de 20 días, las hojas presentan un fuerte gradiente de crecimiento.

Los niveles de expresión relativos se cuantificaron en relación a la  $\beta$ -tubulina (*At5g23860*), que es un gen de expresión constitutiva de *Arabidopsis*. Dicha cuantificación está basada en valores de Ct obtenidos para cada una de las doce galactosidasas en diferentes regiones de la planta (Pfaffl, 2001). La expresión de los genes objeto de estudio está normalizada con respecto a valor de expresión de cada uno de los genes en hoja madura. Los resultados obtenidos que se muestran en la figura IV.5 representan la expresión de los diferentes genes que codifican  $\beta$ -galactosidasas de *Arabidopsis thaliana*.

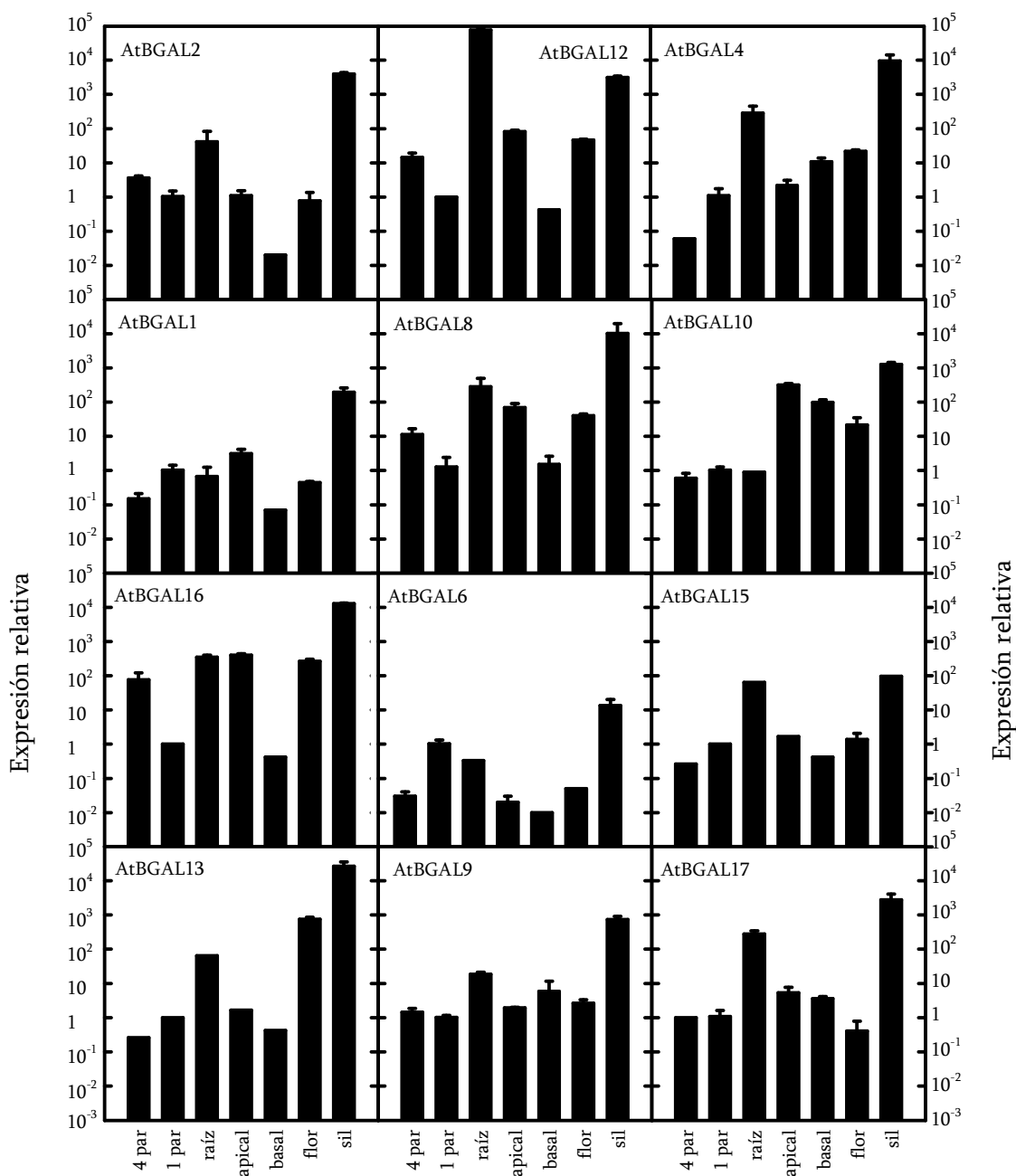


Figura IV.5. Patrón de desarrollo de los genes que codifican las  $\beta$ -galactosidasas en hojas del cuarto y primer par, raíz, tallo apical, tallo basal, flor y silicua.

Los patrones de expresión de los diferentes genes estudiados son muy diversos. En cuanto a la expresión a nivel de hojas, varios de los genes presentan menor expresión en hojas jóvenes con respecto a hojas maduras, como es el caso de *AtBGAL1*, *AtBGAL4*,

*AtBGAL6*, *AtBGAL15*. El hecho de que estos genes se expresen menos en zonas en crecimiento activo, indicaría que no hay correlación entre el desarrollo de la planta y la expresión de dichos genes. Por otro lado, los genes *AtBGAL2*, *AtBGAL8*, *AtBGAL12* y

*AtBGAL16*, presentan un patrón de expresión en hojas opuesto a los anteriores, ya que el nivel de expresión de estos genes es superior en hoja joven con relación a hoja madura. Esto indicaría que el grado de desarrollo influye en la expresión de estos genes y por lo tanto podrían estar implicados en el crecimiento celular. Los restantes genes no presentan diferencias significativas de expresión en relación el grado de desarrollo de la hoja, ya que no hay variación significativa en cuanto a expresión entre hoja en crecimiento y hoja madura.

En cuanto a la expresión a nivel de tallo, también se puede correlacionar con el grado de desarrollo, ya que se puede diferenciar entre tallo superior (joven) y tallo inferior (maduro). En base a esto, los genes que se expresan más en tallo superior, y por lo tanto en la zona de mayor crecimiento, son *AtBGAL1*, *AtBGAL8*, *AtBGAL12*, *AtBGAL16*. Estos genes podrían por lo tanto tener relación con el desarrollo ya que se expresan en la región del tallo que crece de forma activa. Los genes *AtBGAL8*, *AtBGAL12* y *AtBGAL16* podrían estar muy correlacionados con el crecimiento, ya que se expresan más tanto en hoja joven como en tallo apical, las zonas de mayor desarrollo. Prácticamente todos los genes estudiados presentan su mayor expresión en silicuas en comparación con las demás regiones de la planta, con la excepción

del gen *AtBGAL12*, que se expresa más en raíces. Este mayor nivel de expresión probablemente se produzca debido a la presencia de semillas en desarrollo en el interior de las silicuas. De todos los resultados obtenidos en relación con la expresión se deduce, que algunos de los genes que codifican las  $\beta$ -galactosidasas presentan un patrón de expresión relacionado con el estadio de desarrollo. Esto implicaría que dichas galactosidasas podrían estar implicadas en la extensión de la pared celular, aunque en algunos casos el patrón de expresión concuerda con el grado de desarrollo sólo en alguna de las regiones de la planta que han sido estudiadas.

#### IV.3.4. Análisis de mutantes *knockout* de $\beta$ -galactosidasas mediante MALDI-TOF

De las diferentes colecciones de mutantes de *Arabidopsis thaliana*, se seleccionaron mutantes *knockout* correspondientes a las doce  $\beta$ -galactosidasas de este trabajo. Se obtuvieron individuos resistentes a los agentes de selección correspondientes, BASTA, higromicina y kanamicina, hasta obtener la segunda generación descendiente de las procedentes de las colecciones públicas. Se analizó la estructura del xiloglucano de cada individuo seleccionado descendiente de cada mutante original. La composición de oligosacáridos del xiloglucano de los mutantes

se obtuvo mediante tratamiento de sus paredes con una endo- $\beta$ -(1-4)-D-glucanasa y analizando los oligosacáridos producto de la degradación mediante MALDI-TOF MS. En la figura IV.6 se muestra el espectro de masas

correspondiente a diferentes plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 y alguno de los múltiples espectros de masas que difieren de Col 0 y por lo tanto, que presentan una estructura diferente en su xiloglucano.

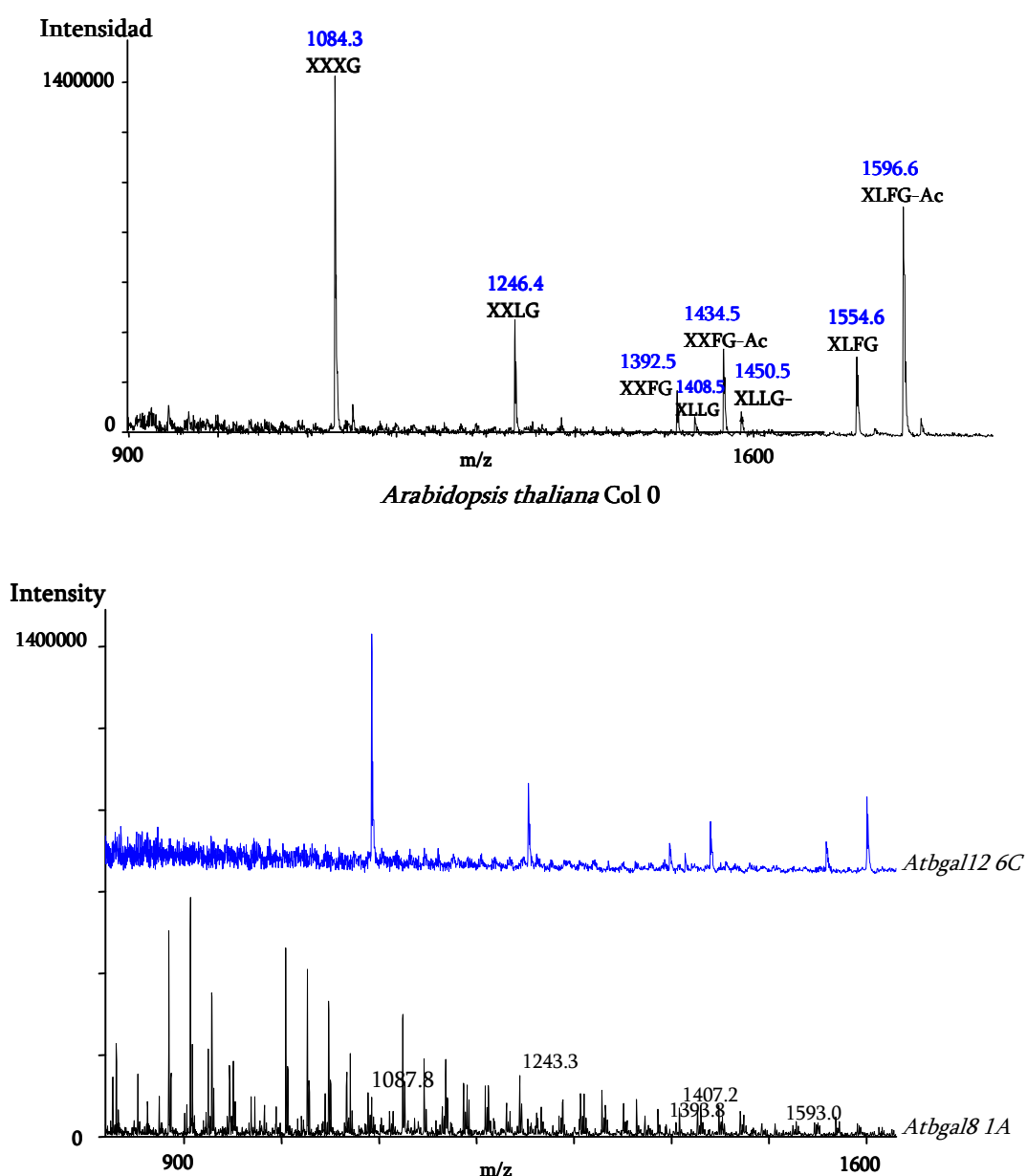


Figura IV.6. Espectros de masas de plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col 0 y mutantes *knockout* de alguna de las  $\beta$ -galactosidasas del xiloglucano de *Arabidopsis*. Se observa claramente la diferencia entre el espectro de masas de Col0 y alguno de los obtenidos tras el análisis de paredes de mutantes.

Los datos obtenidos mediante MALDI-TOF se analizaron posteriormente. En el caso de los individuos silvestres correspondientes a Columbia 0, no existen prácticamente diferencias entre los distintos individuos analizados, aproximadamente 20. En general, los espectros obtenidos para Col0 muestran que el oligosacárido mayoritario de su xiloglucano es XXXG, seguido de XLFG-Ac. En el caso de los mutantes las diferencias se producen respecto al control y entre individuos descendientes del mismo mutante original obtenido de las colecciones públicas.

#### IV.3.5. Análisis de componentes principales

A partir de los espectros de masas obtenidos mediante MALDI-TOF, correspondientes a los diferentes individuos mutantes, se analizaron los datos obtenidos utilizando el programa Win-Das. Se llevó a cabo un análisis de componentes principales, técnica estadística que permite sintetizar información a fin de facilitar su interpretación. En la figura IV.7 se muestran las poblaciones correspondientes a los mutantes de las doce  $\beta$ -galactosidasas y la población correspondiente a Col0.

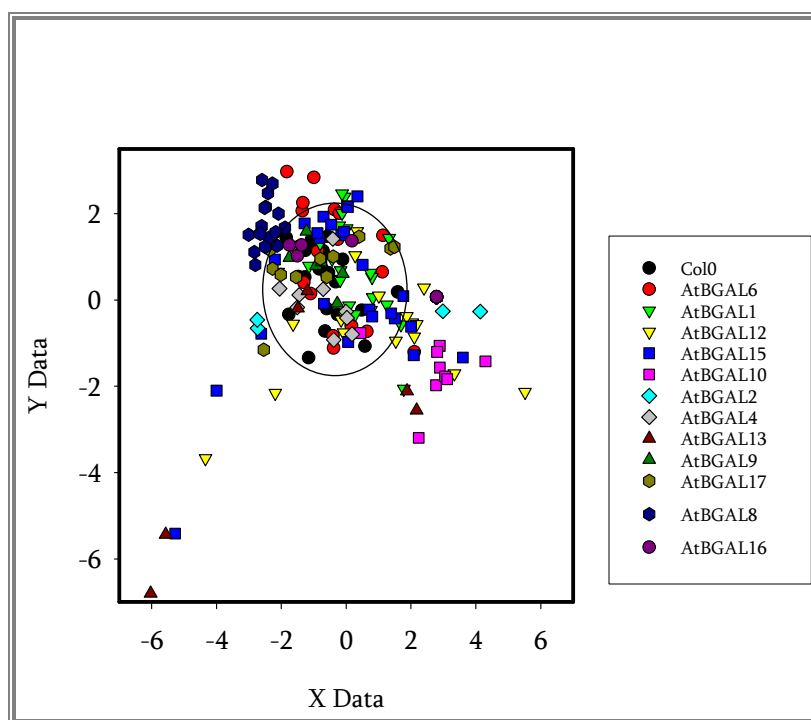


Figura IV.7. Análisis mediante Win-Das de los espectros de masas correspondientes a plantas individuales descendientes de los diferentes mutantes originales. La gráfica en la que se comparan diferentes poblaciones obtenidas mediante Win-Das. La población correspondiente a los individuos utilizados como control (Columbia 0) aparece rodeada con un círculo.

Cada uno de los puntos que forman las diferentes poblaciones correspondientes a cada uno de los mutantes se corresponde con una planta individual, de la que se ha analizado su xiloglucano. Cada planta se designa, al igual que en el caso de las  $\beta$ -glucosidasas, con un número y una letra. Como se observa en la figura IV.7 en el caso de los mutantes de los genes *AtBGAL16*, *AtBGAL9*, *AtBGAL4*, apenas existen diferencias con la población correspondiente a los individuos control. Los genes *AtBGAL6*, *AtBGAL1* y *AtBGAL17* presentan muchos individuos que difieren del control, alguno de ellos será analizado con posterioridad. En otros genes, como *AtBGAL12* y *AtBGAL15* existen varios individuos que se alejan bastante de la población Col0 usada como control. En el caso de los genes *AtBGAL10* y *AtBGAL8* prácticamente todos los individuos mutantes forman una población a parte, completamente diferente del silvestre. Finalmente, los mutantes de los genes *AtBGAL2* y *AtBGAL13* forman una población diferente al control,

pero al mismo tiempo aparecen poblaciones distintas dentro del mismo mutante. Estos resultados nos permiten saber cual o cuales de los individuos mutantes presentan una estructura de su xiloglucano con mayor diferencia respecto al control. En base a los datos obtenidos y teniendo en cuenta también algunos datos fenotípicos, se seleccionaron para su posterior estudio algunos de estos individuos mutantes: *Atbgal1 5H*, *Atbgal6 2G*, *Atbgal8 1A*, *Atbgal10 2B*, *Atbgal12 5F*, *6C*, *4F* y *Atbgal15 3G*, *6A*, *6F*.

#### IV.3.6. Análisis mediante MALDI-TOF de la actividad $\beta$ -galactosidasa

Partiendo de apoplasto de plántulas de *Arabidopsis thaliana*, se analizó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de algunos mutantes frente a los oligosacáridos XLFG y/o XLLG, analizando los productos de digestión mediante MALDI-TOF. En la figura IV.8 se muestran las diferentes vías de degradación de los oligosacáridos de xiloglucano.

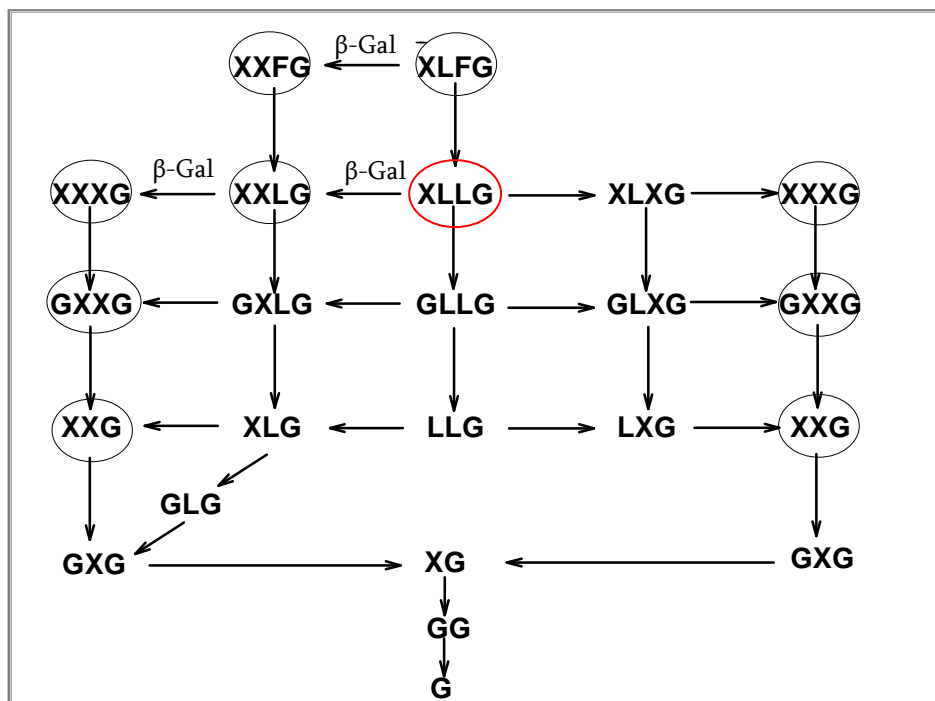


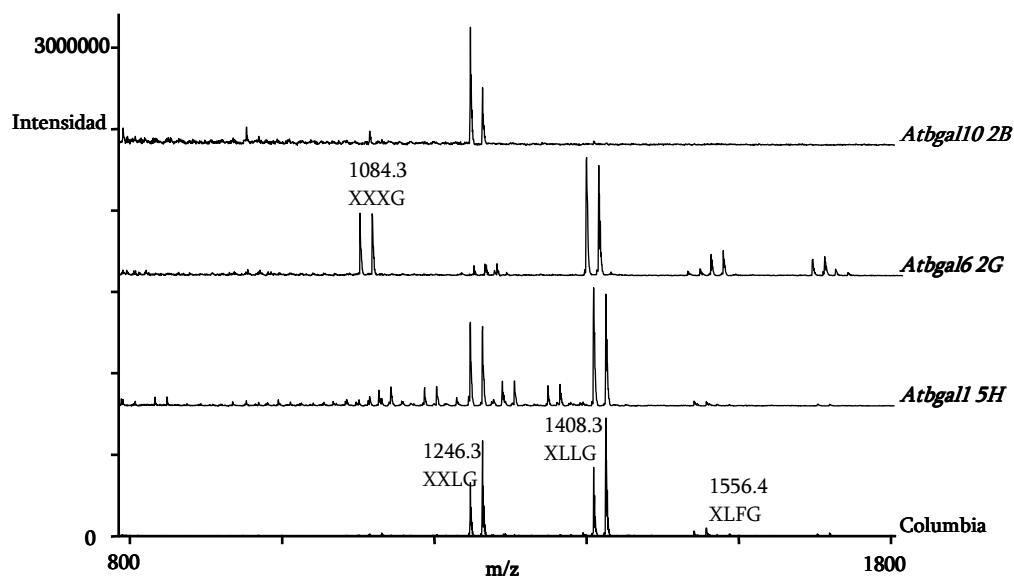
Figura IV.8. Posibles rutas de degradación de los oligosacáridos XLFG y XLLG para dar lugar a XXG. En ambas rutas se muestran los puntos de actuación de las  $\beta$ -galactosidasas.

En la figura se muestran los puntos de actuación de las  $\beta$ -galactosidasas, en ambas rutas hay dos puntos de actuación, en el caso del oligosacárido XLFG se convierte en XXFG por acción de una actividad galactosidasa. Por otro lado, el oligosacárido XLLG por una nueva acción de la galactosidasa da lugar a XXLG o XLXG. Nuevamente la galactosidasa dará lugar a XXXG. Si una de las

galactosidasas en estudio fuese la responsable única de alguna de las reacciones anteriores, sería de esperar que una de las rutas anteriores se interrumpiese en algún punto de actividad galactosidasa.

Los mutantes seleccionados para determinar actividad frente al oligosacárido XLFG fueron *Atbgal1 5H*, *Atbgal6 2G* y *Atbgal10 2B* (Fig. IV.9).





**Figura IV.9.** Actividad de diferentes mutantes de  $\beta$ -galactosidasa sobre el oligosacárido XLFG. Se comparan los espectros obtenidos con el control (Columbia 0).

Los resultados obtenidos difieren entre Columbia y los mutantes seleccionados, ya que en el caso de Col0, tras 14 h de incubación el XLFG da lugar a XLLG por acción de la  $\alpha$ -fucosidasa y este da lugar a XXLG por acción de una  $\beta$ -galactosidasa. El oligosacárido XLFG se degrada casi de forma completa si aumentamos el número de horas de incubación. Los oligosacáridos de menor tamaño aparecen en cantidades relativamente bajas en el caso del control. Para el mutante *Atbgal1 5H*, los resultados obtenidos no difieren de los obtenidos en el caso de Col0, ya que los oligosacáridos XLLG y XXLG están presentes, lo cual nos indica que en principio, la actividad galactosidasa no se vería afectada. Por otro lado, el mutante *Atbgal6 2G*, el oligosacárido XXLG aparece en una

proporción muy baja con respecto al silvestre, tras las mismas horas de incubación y parece que el oligosacárido XLLG tiene una presencia mayor. En principio, estos resultados podrían sugerir que la actividad  $\beta$ -galactosidasa frente a los oligos del xiloglucano está reducida en este individuo. Finalmente, el mutante *Atbgal10 2B*, presenta un comportamiento diferente a los anteriores. No aparece el oligo original (XLFG) ni el siguiente en la ruta (XLLG), pero si aparece una acumulación del oligosacárido XXLG/XLXG. El oligosacárido XXLG da lugar a XXXG por acción de una  $\beta$ -galactosidasa. Por lo tanto, este resultado indicaría que la actividad  $\beta$ -galactosidasa en este individuo mutante podría estar afectada.

Además del sustrato XLFG, se empleó el sustrato XLLG para medir la actividad  $\beta$ -

galactosidasa, y determinar si alguno de los mutantes en estudio presentaba alteraciones. Si la actividad galactosidasa estuviese afectada, sería de esperar que no se produjese la degradación de los sustratos XLLG y/o XXLG (Fig. IV.8). Los mutantes utilizados para medir la actividad galactosidasa frente a XLLG fueron *Atbga16 2G*, *Atbga10 2B*, *Atbga15 3G*, *6A*, *6F*,

*Atbga12 4F*, *5F*, *6C* y *Atbga18 1A*. Estos mutantes fueron seleccionados en base a los resultados de composición de xiloglucano realizados previamente, además alguno de ellos presenta también alteraciones a nivel de fenotipo. Los espectros de masas obtenidos tras 14 h de incubación con el oligosacárido XLLG, son los que se muestran en la figura IV.10.

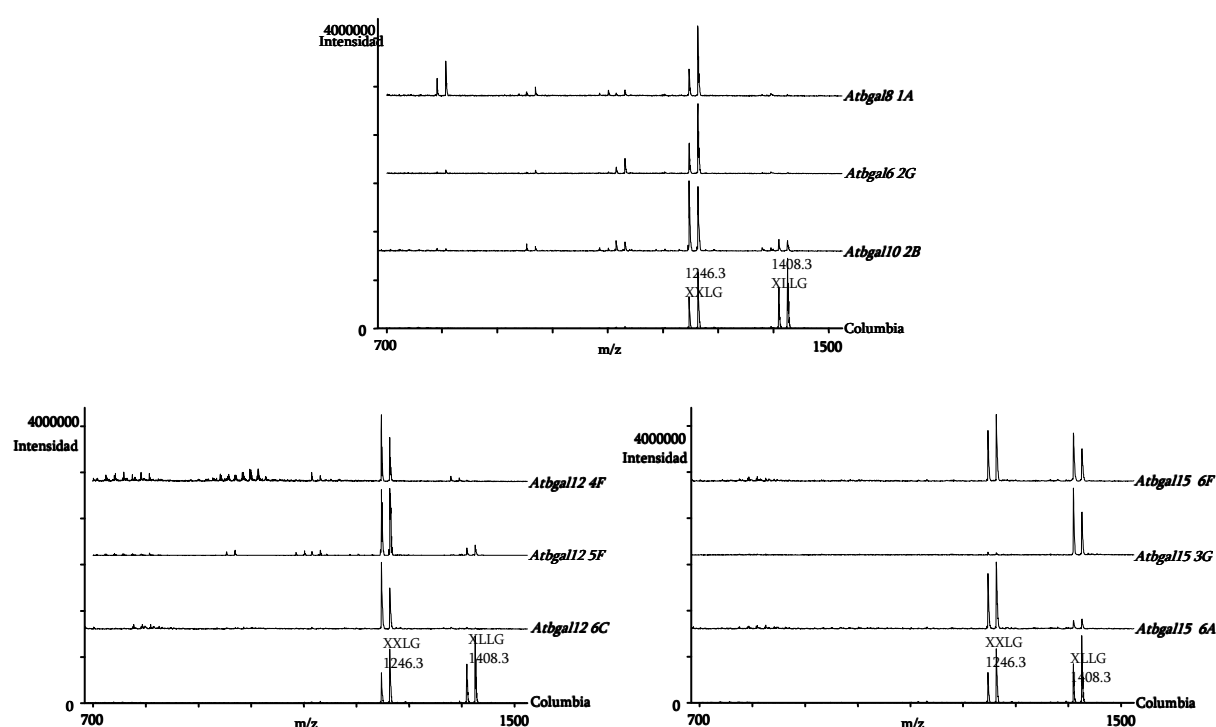


Figura IV.10. Diferentes espectros de masas obtenidos tras la incubación del extracto apoplástico de los diferentes mutantes seleccionados frente al oligosacárido XLLG. El tiempo de incubación del apoplasto con el sustrato es de 14 h.

Como se observa en la figura, en el caso de los mutantes *Atbgal8 1A* o *Atbgal6 2G* los resultados obtenidos no difieren de los correspondientes a Col0. En todos los casos se observa actividad  $\beta$ -galactosidasa, ya que el oligosacárido XLLG da lugar al oligosacárido XXLG/XLXG. Por lo tanto, se puede deducir que la actividad galactosidasa no se ve alterada en ninguno de los tres mutantes anteriores.

Los mutantes del gen *AtBGAL15* presentan diferencias entre ellos y al mismo tiempo con Col0. En el caso de *Atbgal15 6F* y *6A* se observa una actividad galactosidasa con ligeras diferencias con respecto al control, mientras que *Atbgal15 3G* muestra una actividad reducida, ya que se acumula XLLG y el XXLG/XLXG está prácticamente ausente. Los individuos mutantes del gen *AtBGAL12* se comportan de forma similar entre sí, pero de forma ligeramente diferente a Col0, ya que hay actividad  $\beta$ -galactosidasa, pero parece incluso estar incrementada con respecto al control.

Se deduce entonces que de los diferentes mutantes estudiados, uno de los que podría presentar mayor alteración de la actividad galactosidasa es el individuo *Atbgal15 3G*. Se llevaron a cabo repeticiones de los análisis de los diferentes individuos mutantes, los resultados promedio obtenidos en los diferentes análisis de la actividad de los mutantes se muestran en la figura IV.11 en esta gráfica se observa que existen algunas diferencias a nivel de actividad entre los mutantes y Col0, aunque ninguno de ellos presenta una ausencia total de actividad  $\beta$ -galactosidasa. Algunos mutantes como *Atbgl10 2B*, *Atbgal12 5F*, *Atbgal12 6C*, *Atbgal15 3G* o *Atbgal6 2G*, presentan una mayor proporción de XXLG/XLXG lo que podría implicar una reducción en la actividad galactosidasa. Sin embargo, no se puede asociar una falta de actividad a un determinado mutante, ya que en mayor o menor proporción todos los mutantes estudiados degradan el oligosacárido XLLG.

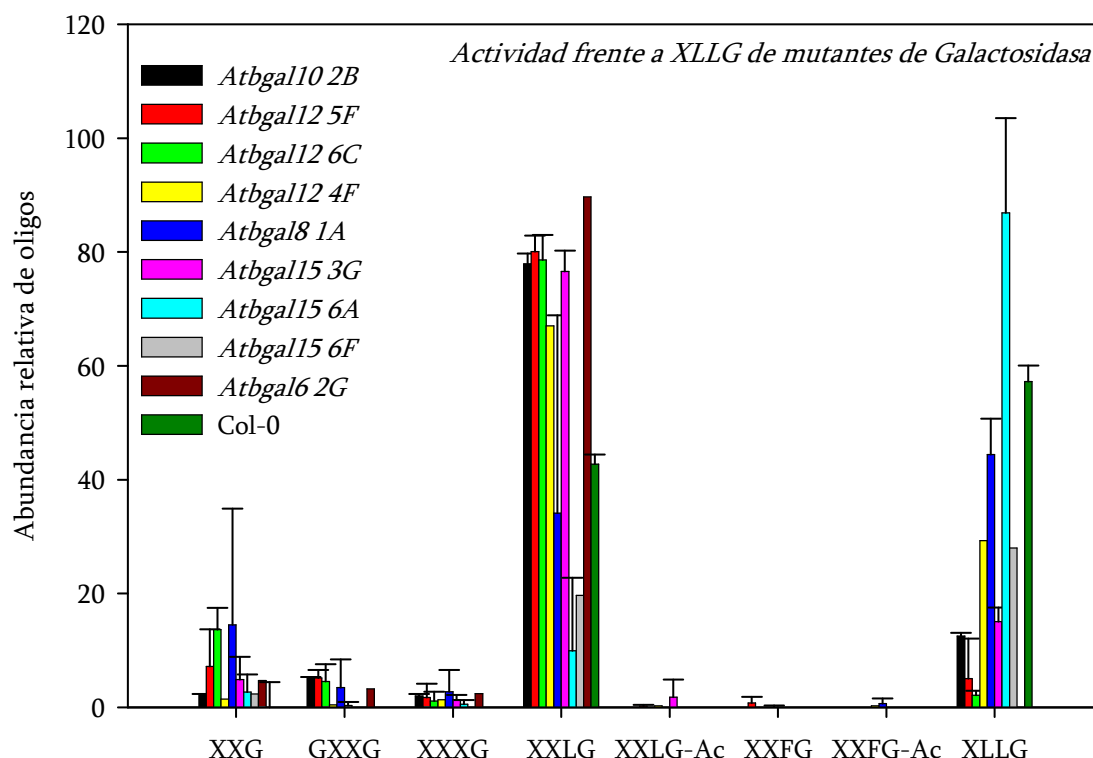


Figura IV.11. En la gráfica se muestran las cantidades relativas de oligosacárido obtenidas a partir de los espectros de masas de la figura anterior. La desviación típica que aparece la figura se obtuvo mediante repeticiones de actividad frente a sustrato de los diferentes mutantes.

#### IV.3.7. Análisis fenotípico de los mutantes seleccionados

Se llevó a cabo un estudio fenotípico de los mutantes *Atbgal10 2B*, *Atbgal12 4F*, *5F*, *6C*, *Atbgal15 3G*, *6A*, *6F*, *5H*, *5E*, *Atbgal8 1A*. De todos los mutantes en estudio solamente uno presenta alteraciones visibles a nivel fenotípico *Atbgal15 3G*, ya que presenta un retardo en el desarrollo floral y un mayor crecimiento vegetativo con respecto a Col0. En la figura IV.12 se muestra una imagen de dicho mutante a los 3 meses de desarrollo. Como se

observa en la figura, el tallo floral no se ha desarrollado, cuando lo normal en *Arabidopsis* sería que el tallo estuviese completamente desarrollado. Por otro lado este mutante no presentaba alteraciones muy notables de la actividad galactosidasa frente al oligosacárido XLLG. En cuanto a la roseta basal, el tamaño es ligeramente superior al del control, y lo que más destaca es la diferencia a nivel de morfología foliar, ya que las hojas son más alargadas y dentadas que en el silvestre.



Figura IV.12. Se muestra una fotografía del mutante *Atbgal15 3G* de 12 semanas de edad frente al silvestre Col0 de aproximadamente unas 6 semanas.

Se llevó a cabo una cinética de crecimiento de los mutantes objeto de estudio y los resultados obtenidos se muestran en la figura IV.13. Los mutantes presentan un crecimiento de la roseta basal muy similar al silvestre (Col0). Algunos de ellos presentan una velocidad ligeramente mayor de crecimiento, es el caso de *Atbgal15 6F* y *Atbgal8 1A*, que crecen más rápido desde el

inicio. En el caso de los individuos mutantes *Atbgal15 3G*, *6A*, *5H* y *3E*, *Atbgal12 4F*, *5F*, *6C* y *Atbgal10 2B* la velocidad de crecimiento es ligeramente menor que la del control. Aunque las diferencias no son importantes, el mutante *Atbgal15 6A* presenta un crecimiento más lento que el silvestre si lo comparamos con los restantes mutantes.

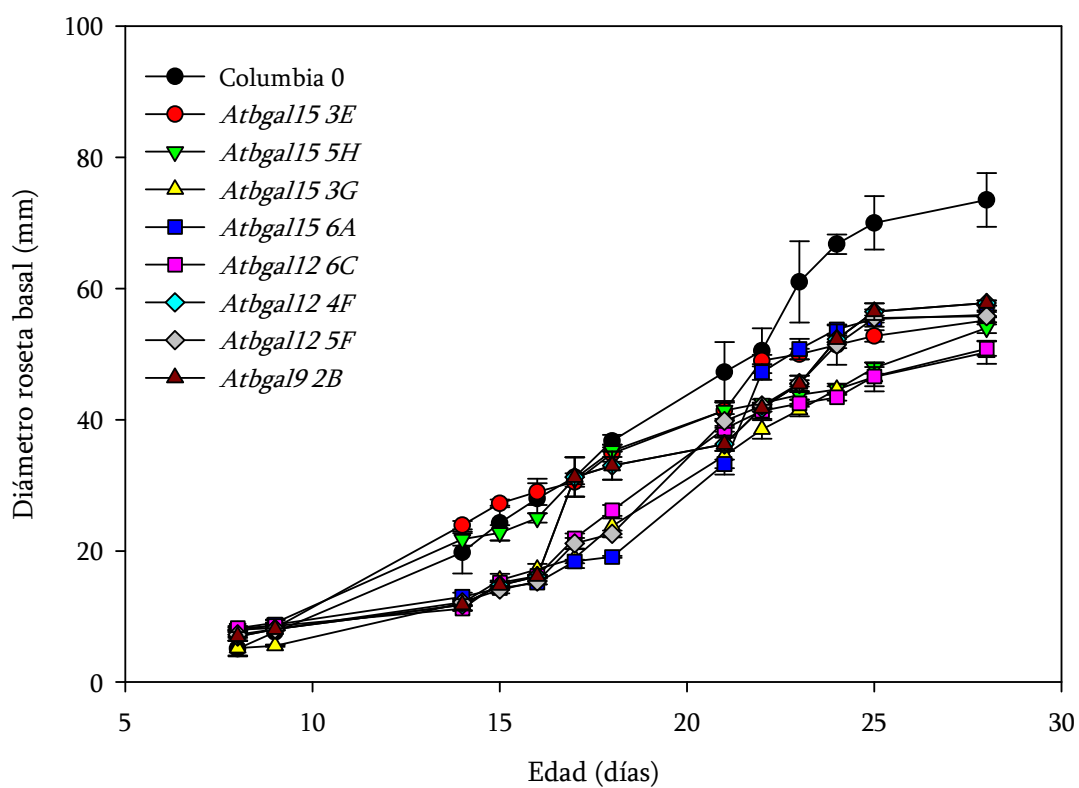
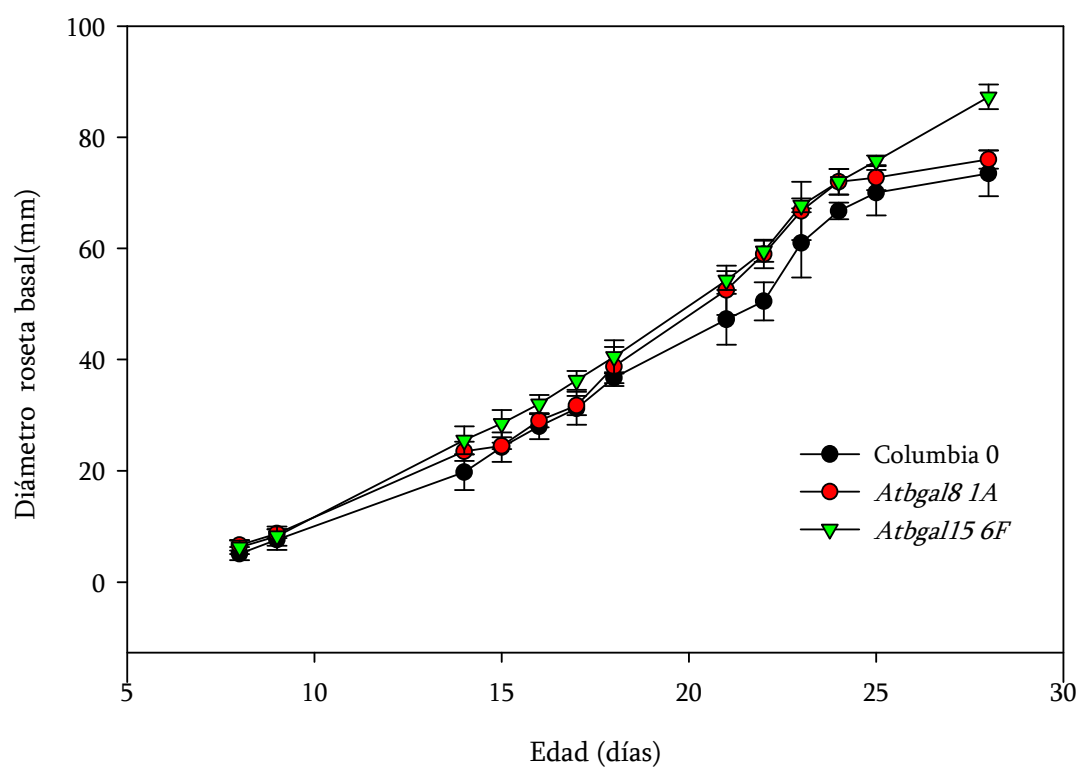


Figura IV.13. Cinética de crecimiento de la roseta basal de los diferentes mutantes de  $\beta$ -galactosidasa seleccionados, se expresa como diámetro de la roseta basal.

Es indiscutible la importancia de las  $\beta$ -galactosidasas en el mecanismo de extensión de la pared celular (Darley y col., 2001), así como la actividad del resto de exoglicosidasas necesarias para la degradación del xiloglucano (Iglesias y col., 2006). Como se mencionó al inicio de este capítulo han sido identificados diferentes sustratos para las  $\beta$ -galactosidasas (Smith y Gross, 2000). Además, estas enzimas, pueden actuar en diferentes etapas del desarrollo de forma coordinada (Esteban y col., 2003; Esteban y col., 2005) y en diferentes condiciones (Dey y del Campillo, 1984). Todas estas características, hacen de las  $\beta$ -galactosidasas un grupo de enzimas muy complejo para su estudio. Dentro de la familia 35 de las glicosil hidrolasas hemos seleccionado doce genes que codificarían posibles galactosidasas de *Arabidopsis thaliana*, capaces de actuar sobre el xiloglucano y/o sus oligosacáridos y por lo tanto implicadas en la extensión de la pared celular vegetal. En base a los diferentes datos de  $\beta$ -galactosidasas en distintas especies, se realizó un árbol filogenético con las galactosidasas con alta probabilidad de dirigirse al apoplasto. De esta forma seleccionamos los doce genes estudiados en este capítulo, *AtBGAL1*, *AtBGAL2*, *AtBGAL4*, *AtBGAL6*, *AtBGAL 8*, *AtBGAL9*, *AtBGAL10*, *AtBGAL12*, *AtBGAL13*, *AtBGAL15*, *AtBGAL16* y *AtBGAL17* como

posibles genes de *Arabidopsis* implicados en el crecimiento celular. El análisis de los microarrays disponibles en la red, mostró una gran variabilidad en cuanto a expresión para las galactosidasas en estudio. Estos datos, se corroboraron mediante PCR en tiempo real. De ambos análisis se dedujo que algunas  $\beta$ -galactosidasas presentan un patrón de expresión relacionado con el desarrollo en una o más regiones de la planta, lo cual sería indicativo de su posible participación en el crecimiento de la pared. El estudio de los mutantes *knockout* de las doce posibles galactosidasas, reveló que algunos de ellos presentaban una estructura de su xiloglucano diferente al control Col-0. En concreto, *AtBGAL8* y *AtBGAL10* formaron una población completamente diferente al control. Por otro lado, *AtBGAL2* y *AtBGAL13* constituyen un grupo con un xiloglucano distinto al control, pero al mismo tiempo con mucha variabilidad dentro del propio grupo. Otros genes como *AtBGAL1*, *AtBGAL6* o *AtBGAL17* presentan solo algún individuo que difiere de Col-0, pero los demás presentan un xiloglucano muy similar al silvestre. A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron algunos mutantes para analizar su actividad frente a sustrato (XLFG y XLLG). De todos los individuos analizados, *Atbgal13 3G* presentaba alteraciones a nivel de actividad con respecto a

Col-0. Sin embargo, todos los individuos analizados presentaron actividad galactosidasa, aunque en algunos casos fuera relativamente baja. Sería de esperar que si alguna de las galactosidasas en estudio fuese la responsable única de dicha actividad, la reacción de degradación del oligo no se completaría. Los análisis de fenotipo no dieron variaciones importantes, solo uno de los mutantes parecía presentar diferencias con el silvestre, *Atbgal15 3G*, que presentaba un retraso en el desarrollo floral con respecto a Col-0. En resumen, ninguno de los análisis realizados nos permitió determinar cual o cuales son las galactosidasas del xiloglucano en *Arabidopsis thaliana*, ya que el gran número de posibles enzimas responsables junto con la variabilidad que presentan, dificulta su estudio. Serán necesarios posteriores estudios para determinar si alguno de los doce genes codifica la/s  $\beta$ -galactosidasa/s implicada/s en el metabolismo del xiloglucano.





*Capítulo V: Discusión general*  
*Capítulo VI: Conclusiones*



El xiloglucano es la hemicelulosa más importante de la pared celular primaria de dicotiledóneas como *Arabidopsis thaliana*. Se une a microfibrillas de celulosa para dar lugar a la red xiloglucano-celulosa, capaz de soportar la tensión generada por la presión de turgencia de las células. Esta red, sometida a la acción de diferentes enzimas capaces de modificarla, es capaz de extenderse posibilitando el crecimiento celular. La dinámica de la red xiloglucano-celulosa ha sido propuesta como el principal factor que controla la expansión celular y el crecimiento de la planta.

#### Enzimas relacionadas con el metabolismo del xiloglucano: $\beta$ -glucosidasas y $\beta$ -galactosidasas

Hasta el momento han sido identificadas en *Arabidopsis* una  $\alpha$ -xilosidasa (Sampedro y col., 2001) y una  $\alpha$ -fucosidasa (de la Torre y col., 2002) capaces de actuar sobre oligosacáridos de xiloglucano en la pared celular. Además de estas exoglicosidasas apoplásticas se necesitan al menos otras dos actividades enzimáticas,  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -galactosidasa, para llevar a cabo la degradación completa de los oligosacáridos de xiloglucano. En este trabajo, hemos profundizado en el estudio de ambas actividades. La actuación secuencial de las cuatro glicanasas mencionadas es capaz de degradar el xiloglucano polimérico a sus correspondientes

monómeros. La ruta propuesta para degradación de los oligosacáridos de xiloglucano aparece representada en la figura IV.8 de este trabajo y es la siguiente: XLFG $\rightarrow$  XXFG $\rightarrow$  XXLG $\rightarrow$  XXXG $\rightarrow$  GXXG $\rightarrow$  XXG (Iglesias y col., 2006); Koyama y col. proponen en hipocótilos de soja la degradación del xiloglucano en fragmentos grandes que luego son degradados a monosacáridos (Koyama y col., 1981). Los oligosacáridos formados poseen la capacidad de regular el crecimiento de la planta, de ahí la importancia de dichas actividades enzimáticas (Creelman y Mullet, 1997).

#### $\beta$ -glucosidasas relacionadas con el desarrollo

Como ya vimos a lo largo de este trabajo las  $\beta$ -glucosidasas, actúan frente a oligosacáridos de xiloglucano que presentan una glucosa no sustituida en su extremo no reductor (Crombie y col., 1998). Sin embargo, estas enzimas no pueden actuar cuando la glucosa contigua lleva unido un resto de galactosa, lo que hace pensar, que previamente actuarán el resto de exoglicosidasas del xiloglucano. Las cuatro  $\beta$ -glucosidasas objeto de estudio pertenecen a la familia 3 de las glicosil hidrolasas y están situadas en los cromosomas 3 (*AtBGLC4*) y 5 (*AtBGLC1*, *AtBGLC2*, *AtBGLC3*) de *Arabidopsis thaliana*. Dichas glucosidasas han sido seleccionadas en

base a la similitud con la identificada por Crombie y col. en *Tropaeolum majus* y cuya actividad frente a oligosacáridos de xiloglucano ha sido demostrada (Crombie y col., 1998) (Figura II.6). Hay que destacar la alta similitud entre las secuencias que codifican estas cuatro posibles glucosidasas de *Arabidopsis*, que es de hasta un 82% entre *AtBGLC1* y *AtBGLC2* (Figura II.8).

El efecto de las actividades  $\beta$ -glucosidasa y  $\alpha$ -xilosidasa apoplásticas sobre los oligosacáridos de xiloglucano, se estudió con detalle analizando los productos de degradación del heptasacárido XXXG (Iglesias y col., 2006) (Figura II.10). Los resultados obtenidos confirman la actuación en primer lugar de la xilosidasa, dando lugar al oligosacárido GXXG, que será degradado por la glucosidasa dando lugar a la aparición de XXG. El hecho de que GXXG aparezca en menor cantidad que XXG o XXXG sugiere que la glucosidasa presenta mayor actividad en apoplasto que la xilosidasa (Figura II.11). Si consideramos que la presencia de xilosa como sustituyente de la glucosa en el extremo no reductor, es un requisito estructural del xiloglucano para poder actuar como aceptor de la XET (Lorences, 2004), la acción de la xilosidasa lo inactivaría como aceptor, mientras que la glucosidasa volvería a restaurar su capacidad como aceptor de la transglicosilación. Por lo tanto, la actividad

alternada de ambas enzimas podría jugar un papel importante en la regulación de la actividad XET. Cuando se comparan los niveles de expresión de ambas enzimas, se observa que la ratio  $\alpha$ -xilosidasa/ $\beta$ -glucosidasa en diferentes regiones de la planta o en diferentes estados de desarrollo, podría controlar la elongación celular (Iglesias y col., 2006). Ambas actividades, xilosidasa y glucosidasa, son las responsables de la degradación del eje principal de las cadenas de xiloglucano. Por lo tanto, las actividades  $\beta$ -glucosidasa y  $\alpha$ -xilosidasa, podrían estar reguladas independientemente, variando según el órgano y el estado de desarrollo, modulando el crecimiento de la planta a través de la actividad XET.

Cuando se llevó a cabo el análisis de expresión de las diferentes  $\beta$ -glucosidasas de interés, se observó que todas presentan un patrón de expresión relacionado con el grado de desarrollo en una o varias regiones de la planta (Figura II.9). Así, el gen *AtBGLC1*, presenta mayor expresión en hoja joven frente a hoja madura, al igual que ocurre con los genes *AtBGLC2* y *AtBGLC3*. Estos dos últimos presentan además, una mayor expresión en la zona apical del tallo que está en crecimiento. En el caso del gen *AtBGLC4*, su expresión se relaciona con el desarrollo en tallo, pero no en hoja. Los genes que codifican las glucosidasas en estudio presentan una expresión

correlacionada con el grado de desarrollo en hojas, tallo o en ambas regiones de la planta. En base a los resultados de expresión obtenidos, se deduce que no se puede descartar la implicación en el crecimiento celular de ninguna de las cuatro posibles glucosidasas de *Arabidopsis thaliana*.

### Caracterización de mutantes *knockout* de $\beta$ -glucosidasas

La composición de oligosacáridos de xiloglucano de las paredes celulares permite establecer una relación directa con la actividad de las diferentes exoglicosidasas que actúan sobre el xiloglucano (Fry, 1995). Dichos oligosacáridos, como ya se ha mencionado, poseen la capacidad de modular el crecimiento de la planta (Creelman y Mullet, 1997). En nuestro trabajo, hemos determinado la composición de oligosacáridos de xiloglucano de paredes celulares de mutantes *knockout* correspondientes a las cuatro glucosidasas en estudio (Figura II.14). Cuando se comparó la composición de oligosacáridos de la segunda generación de mutantes sometidos a agentes de selección con la de Col-0, observamos que algunos presentan diferencias muy significativas. En primer lugar, la variabilidad que se observa entre los individuos de la población control es muy baja, lo que indica que el control es una población básicamente homogénea. Sin embargo esto no pasa con las

poblaciones mutantes, ya que algunos de los individuos difieren mucho entre sí. Cuando se compararon las poblaciones mutantes con el control, se observa que hay individuos con una composición oligosacáridica de sus paredes completamente diferente a Col-0. Esto, a priori, significaría que la actividad glucosidasa mutada provoca cambios a nivel de estructura del xiloglucano. Sin embargo, es importante poder establecer una relación entre los cambios mencionados y la mutación, así como las posibles variaciones que dicha mutación provoca a nivel de fenotipo morfológico. Estos primeros estudios estructurales junto con los de expresión en diferentes partes de la planta, nos permitieron establecer una criba y seleccionar aquellos individuos mutantes que en principio parecían interesantes. De hecho, los mutantes del gen *AtBGLC1*, presentan diferencias muy importantes en la estructura de su xiloglucano con respecto a Col-0 y además variaciones morfológicas interesantes.

Algunos de los mutantes seleccionados para cada una de las cuatro glucosidasas (*AtBGLC1*, *AtBGLC2*, *AtBGLC3*, *AtBGLC4*), en base a los criterios expuestos con anterioridad, fueron analizados en base a su actividad frente al sustrato XXXG (Figura III.4). El estudio de actividad aportó resultados importantes, entre los que cabe destacar que la actividad  $\alpha$ -xilosidasa (Sampedro y col., 2001), parece ,a priori, no estar afectada en ninguno

de ellos. De los diferentes individuos analizados, el mutante *Atbglc1 4D*, presenta una actividad glucosidasa frente a xiloglucano nula o prácticamente nula. Este mutante presentaba niveles muy bajos de oligosacárido XXG, esto supondría que si en *Arabidopsis* hay una única glucosidasa que actúa sobre el xiloglucano, podría ser la codificada por el gen *AtBGLC1*. El oligosacárido GXXG, en el mutante *Atbglc1 4D*, podría incorporarse a las cadenas de xiloglucano polimérico en lugar de degradarse a XXG, de ahí la abundante presencia de GXXG en el xiloglucano de este mutante. Esto daría lugar a la depolimerización del xiloglucano, que provocaría el debilitamiento de la pared celular. Este debilitamiento podría originar un incremento del tamaño celular y finalmente de los diferentes órganos de la planta, algo que hemos observado en los individuos correspondientes a *Atbglc1 4D*. En los mutantes para los restantes genes la actividad glucosidasa es normal o está ligeramente reducida, lo que nos indica que pese a la presencia de la mutación, está presente el oligosacárido XXG resultante de dicha actividad. En algunos de los mutantes el oligosacárido GXXG no está presente, esto puede explicarse por una actividad glucosidasa que lo transforme en XXG (Figura III.4). La ausencia de actividad en el mutante *Atbglc1 4D*, indicaría que la glucosidasa codificada por

el gen *AtBGLC1* podría ser la responsable de modificar el xiloglucano *in vivo* (Edwards y col., 1985), en *Arabidopsis thaliana* (Fry, 1995). Esto implica que podría tener un papel muy importante en el crecimiento celular y por lo tanto en el desarrollo de la planta (Cosgrove, 1993).

### El gen *AtBGLC1* como posible responsable de la actividad $\beta$ -glucosidasa

El hecho de que el producto del gen *AtBGLC1* pudiera ser el responsable de la actividad glucosidasa *in vivo*, llevó a un estudio detallado del mismo. Se comprobó que el individuo *Atbglc1 4D* era homocigoto para la mutación y que presentaba la inserción correspondiente con la orientación adecuada (Figura III.5). Se comprobó que el gen *AtBGLC2*, en tándem con *AtBGLC1*, se expresa con normalidad en el mutante *Atbglc1 4D* (Figura III.6). Esta mutación en el individuo *Atbglc1 4D*, reduce la capacidad de degradar oligosacáridos de xiloglucano y por lo tanto su capacidad de incorporación al polímero (Figura III.3). El análisis fenotípico de este mutante se llevó a cabo en comparación con Columbia-0 y Nossen-0, que morfológicamente no presentan diferencias significativas. El mutante en estudio presenta un tamaño superior al silvestre en las diferentes partes de la planta, y además una velocidad de crecimiento superior (Figuras

III.7 y III.8). Los resultados obtenidos para el mutante *Atbglc1 4D* homocigoto que presenta una inserción en el primer exón del gen correspondiente, que carece de actividad glucosidasa y que presenta diferencias morfológicas con respecto a silvestre, nos llevan a plantear al gen *AtBGLC1* como posible responsable de la actividad  $\beta$ -glucosidasa en *Arabidopsis thaliana*.

### **$\beta$ -galactosidasas relacionadas con el desarrollo**

Las  $\beta$ -galactosidasas, son enzimas capaces de hidrolizar residuos  $\beta$ -galactosil de oligosacáridos de xiloglucano. Se purificó una  $\beta$ -galactosidasa (EC 3.2.1.23) de los cotiledones de *Nasturtium* que cataliza la rápida hidrólisis de los residuos  $\beta$ -galactopiranosil de xiloglucanos intactos, pero el gen responsable de dicha actividad no ha sido clonado (Edwards y col., 1988; Chengappa y col., 1996). Además, diferentes estudios muestran que las  $\beta$ -galactosidasas pueden catalizar reacciones bajo condiciones muy diversas, sobre numerosos sustratos específicos y en diferentes localizaciones, lo que implica que poseen diversos papeles en el metabolismo de gran número de sustratos (Dey y del Campillo, 1984; Kulikova y col., 1990). Dado que las galactosidasas pueden catalizar la hidrólisis de residuos de galactosa de diferentes polímeros, no se conoce con exactitud los sustratos sobre los que actúan de forma natural. En

*Arabidopsis thaliana* hemos estudiado doce posibles  $\beta$ -galactosidasas (*AtBGAL1*, *AtBGAL2*, *AtBGAL4*, *AtBGAL6*, *AtBGAL8*, *AtBGAL9*, *AtBGAL10*, *AtBGAL12*, *AtBGAL13*, *AtBGAL15*, *AtBGAL16*, *AtBGAL17*) pertenecientes a la familia 35 de las glicosil hidrolasas (Ahn y col., 2007) que se encuentran en los cinco cromosomas que componen el genoma de *Arabidopsis* (Figura IV.2). De todas estas  $\beta$ -galactosidasas es *AtBGAL10* la que presenta una mayor similitud con la identificada en *Tropaeolum majus*, lo que a priori, la convierte en una buena candidata a galactosidasa del xiloglucano en *Arabidopsis*. No obstante, la dificultad está en saber si sólo hay una o si por el contrario, son varias las enzimas responsables de dicha actividad.

Como hemos visto, la importancia de las  $\beta$ -galactosidasas radica en su posible capacidad de actuar en el metabolismo del xiloglucano y por lo tanto de modular el crecimiento de la pared celular junto con otras exoglicosidasas que han sido descritas en trabajos previos (Fry, 1995). El análisis de expresión de los doce genes que codifican las posibles  $\beta$ -galactosidasas de *Arabidopsis thaliana* aportó datos interesantes para su estudio. Los resultados obtenidos se compararon con los *microarrays* publicados en la red (Tabla IV.4). El estudio en detalle de todos estos datos nos permitió comprobar la amplia variabilidad a



nivel de expresión, que existe dentro de este grupo de genes. Muchos de estos genes se expresan en órganos de la planta en crecimiento activo lo cual sería indicativo de su implicación en el desarrollo celular. Sin embargo, cuando se estudia la expresión en diferentes regiones de la planta se observa que no hay correlaciones claras expresión/desarrollo para un único gen de  $\beta$ -galactosidasa, lo que dificulta el estudio de estas enzimas (Figura IV.5).

#### Análisis de mutantes *knockout* de $\beta$ -galactosidasas

Al igual que con las  $\beta$ -glucosidasas, en el caso de  $\beta$ -galactosidasas, se determinó la estructura del xiloglucano de paredes celulares de mutantes *knockout* para los doce genes correspondientes (Figura IV.7). Como control utilizamos una población homogénea de Col-0. Los resultados obtenidos permitieron determinar qué individuos mutantes que presentaban un xiloglucano más diferente al control. Al igual que en el caso de glucosidasas, los estudios de expresión junto con el estudio estructural, nos permitió seleccionar algunos individuos mutantes, que a priori podían ser de interés en estudios posteriores.

Se midió la actividad de los mutantes *Atbgal1 5H*, *Atbgal6 2G* y *Atbgal10 2B* frente al sustrato XLFG y se comparó con Col-0

(Figura IV.9). Se comprobó de esta forma, que solo el mutante *Atbgal6 2G* presentaba una cierta acumulación del oligosacárido XLFG. Estos resultados sugieren que la actividad galactosidasa está reducida pero que la mutación no la anula. También se estudió la actividad de los mutantes *Atbgal6 2G*, *Atbgal8 1A*, *Atbgal10 2B*, *Atbgal12 4F*, *5F*, *6C* y *Atbgal15 3G*, *6A*, *6F* frente al sustrato XLLG comparada con Col-0 (Figura IV.10). Este análisis reveló que de todos los mutantes estudiados sólo *Atbgal15 3G* presenta una alteración en la actividad galactosidasa. Al igual que pasaba con el mutante *Atbgal6 2G*, *Atbgal15 3G* no presenta una anulación completa de la actividad glucosidasa. Estos resultados indican que existe una gran variabilidad dentro de  $\beta$ -galactosidasas. Por un lado, son doce posibles genes en estudio que pueden actuar en diferentes puntos de la ruta de degradación de los oligosacáridos de xiloglucano. Por otro lado, ninguno de ellos presenta unas alteraciones de estructura o actividad lo suficientemente grandes como para ser el responsable único de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en *Arabidopsis thaliana*.

Posterior análisis fenotípicos y de crecimiento indican que prácticamente ninguno de los mutantes mencionados anteriormente presenta diferencias significativas con Col-0, con excepción de *Atbgal15 3G*, que presenta un tamaño superior

al silvestre y una velocidad de crecimiento mucho más lenta (Figura IV.13).

En base a todos los resultados obtenidos para  $\beta$ -galactosidasas, no podemos concluir que gen o genes están involucrados en la eliminación de la galactosa del xiloglucano. Serán necesarios posteriores estudios más detallados para determinar cual o cuales de los doce genes es el responsable de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en *Arabidopsis thaliana*. Si bien la mutación del gen *AtBGAL10* causa efectos sobre la estructura del xiloglucano, los datos obtenidos hasta el momento no permiten concluir que sea este el gen responsable único de la actividad  $\beta$ -galactosidasa sobre el xiloglucano de *Arabidopsis thaliana*.

En resumen, serían necesarios algunos experimentos que nos permitiesen afirmar de forma rotunda que el gen *AtBGLC1* codifica la  $\beta$ -glucosidasa del xiloglucano. Habría que estudiar en detalle los mutantes de los otros tres genes que codifican posibles glucosidasas, fundamentalmente *AtBGLC2*, ya que se encuentra en tándem con *AtBGLC1*. En cuanto a las  $\beta$ -galactosidasas activas frente a

xiloglucano, se siguen realizando estudios a fin de determinar, en principio, si la responsable de dicha actividad es una sola enzima o más de una. A priori, es *AtBGAL10* la que parece la principal responsable de la actividad galactosidasa, aunque está por determinar si es la única. El estudio de las galactosidasas es complicado debido al número de posibles candidatas y a la gran variedad de sustratos que pueden presentar. Podemos pensar que si hay más de una  $\beta$ -galactosidasa implicada en la degradación del xiloglucano, será difícil determinar cual es el grado de implicación de cada una de ellas en el metabolismo del polímero. El conocimiento de las enzimas responsables de las cuatro diferentes actividades exoglicosidasas, nos permitiría profundizar en el estudio del metabolismo del xiloglucano, relacionado con el crecimiento celular y por lo tanto con el desarrollo de la planta.

1. Basándonos en los estudios realizados mediante incubación de oligosacáridos de xiloglucano con fluido apoplástico procedente de plantas de *Arabidopsis* establecimos la siguiente ruta de degradación. XLFG → XXFG → XXLG → XXXG → GXXG → XXG → GXG → XG → GG.

2. El análisis de la estructura del xiloglucano de mutantes knockout de genes de  $\beta$ -glucosidasas con alto grado de homología con la  $\beta$ -glucosidasa de *Tropaeolum majus*, única hasta el momento con actividad probada sobre la glucosa terminal del xiloglucano, nos permitió seleccionar *AtBGLC1* como candidato en *Arabidopsis* para participar en la degradación del xiloglucano.

3. El estudio del mutante *Atbglc1 4D* reveló que la falta de expresión de éste gen produce un aumento en los niveles de GXXG en el xiloglucano, como consecuencia de la reducción en la actividad  $\beta$ -glucosidasa encargada de eliminar la glucosa terminal no sustituida del extremo no-reductor de la cadena de xiloglucano. La acción de la  $\alpha$ -xilosidasa específica produce GXXG que al no poder degradarse por la reducción de la actividad glucosidasa, se incorpora al xiloglucano mediante la acción de las XETs.

4. A pesar de la proximidad física entre el gen *AtBGLC1* y el *AtBGLC2*, el mutante knockout *Atbglc1 4D* aislado únicamente no ve afectada la expresión de *AtBGLC2* por lo que el fenotipo observado es debido a la no expresión de *AtBGLC1* y no a efectos colaterales sobre *AtBGLC2*.

5. El mutante *Atbglc1 4D* presenta un mayor crecimiento de la roseta basal, no sólo en diámetro de la misma sino también en longitud de las hojas. El desarrollo radicular del mutante también es muy superior al de las plantas control (ecotipo No-0). A nivel histológico de hojas, y cortes transversales de tallo también se observa un mayor desarrollo en las plantas del mutante.

6. El estudio del gen *AtBGLC1* mediante construcciones GUS reveló una mayor expresión de *AtBGLC1* en hojas jóvenes respecto a las maduras, así como una expresión mayor en las venas de las hojas asociadas al desarrollo del sistema vascular.

7. El estudio de los mutantes knockout de  $\beta$ -galactosidasas apoplásticas de la familia 35 mostró diversos efectos sobre el fenotipo morfológico y la estructura del xiloglucano. Algunos de los mutantes en estudio que presentaron diferencias estructurales con

respecto a Col-0, fueron los mutantes de los genes *AtBGAL8* y *AtBGAL10*, que formaron una población completamente diferente al control. En cuanto a las diferencias morfológicas, la más evidente es la del mutante *Atbgal15 3G* que presenta un retardo en el desarrollo floral y un mayor crecimiento vegetativo con respecto a Col-0.



*Bibliografia*



- Acebes JL, Lorences EP, Revilla G, Zarra I** (1993) Pine xyloglucan. Occurrence, localization and interaction with cellulose. *Physiologia Plantarum* 89: 417-422
- Ahn YO, Zheng M, Bevan DR, Esen A, Shiu SH, Benson J, Peng HP, Miller JT, Cheng CL, Pouton JE, Shih MC** (2007) Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 35. *Phytochemistry* 68: 1510-1520
- Albersheim P, Nevins D, English PD, Karr A** (1967) A method for the analysis sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate Research* 5: 340-345
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hayama H, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR** (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer TL, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman AJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402
- Augur C, Benhamou N, Darvill A, Albersheim P** (1993) Purification, characterization, and cell wall localization of an  $\alpha$ -fucosidase that inactivates a xyloglucan oligosaccharin. *Plant J* 3: 415-426
- Bacic A, Harris PJ, Stone BA** (1988) Structure and function of plant cell walls. *The biochemistry of plants*: 297-371
- Bauer WD, Talmadge KW, Keegstra K, Albersheim P** (1973) The structure of plant cell walls. II. The hemicellulose of the wall of suspension cultured sycamore cells. *Plant Physiol* 51: 174-187
- Baydoun EAH, Fry SC** (1989) In vivo degradation and extracellular polymeric-binding of xyloglucan nonsaccharide, a naturally-occurring anti-auxin. *Journal of Plant Physiology* 134: 453-459
- Bechtold N, Ellis J, Pelletier G** (1993) *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Compt Rend Acad Sci Paris Life Sci* 316: 1194-1199
- Becnel J, Natarajan M, Kipp A, Braam J** (2006) Developmental expression patterns of *Arabidopsis* XTH genes reported by transgenes



- and Genevestigator. *Plant Molecular Biology* 61: 451-467
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G** (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Chemistry* 54: 484-489
- Bouchez D, Camilleri C, Caboche M** (1993) A binary vector based on Basta resistance for in planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. *C R Acad Sci Paris, Sciences de la vie/Life sciences* 316: 1188-1193
- Bouton S, Levoeuf E, Mouille G, Leydecker MT, Talbotec J, Granier F, Lahaye M, Hofte H, Truong HN** (2002) QUASIMODO1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 2577-2590
- Brown R, Saxena I** (2000) Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 57-67
- Brumell D, Lashbrook CC, Bennett AB** (1994) Plant endo- $\alpha$ -1,4-glucanases: structure, properties and physiological function. Enzymatic conversion of biomass for fuels production 566: 100-129
- Buckeridge MS, Pessoa dos Santos H, Tine MA** (2000) Mobilisation of storage cell walls polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 141-156
- Campbell JA, Davies GJ, Bulone V, Henrissat B** (1997) A classification of nucleotide diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 326: 929-939
- Carey AT, Holt K, Picard S, Wilde R, Tucker AG, Bird CR, Schuch W, Semour GB** (1995) Tomato exo-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactanase: Isolation, changes during ripening in normal and mutant tomato fruit, and characterization of a related cDNA clone. *Plant Physiol* 108: 1099-1107
- Carpita NC, Gibeaut DM** (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 3: 1-30
- Cassab GI, Varner JE** (1988) Cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39: 321-353
- Catala C, Rose JKC, Bennett AB** (1997) Auxin regulation and spatial localization of an endo-1,4- $\alpha$ -D-glucanase and xyloglucan endotransglycosylase in expanding tomato hypocotyls. *Plant J* 12: 417-426
- Cavalier DM, Keegstra K** (2006) Two xyloglucan xylosyltransferases catalyze the addition of

- multiple xylosyl residues to cellohexaose. *J Biol Chem* 281: 34197-34207
- Chanliaud E, De Silva J, Strongitharm B, Jeronimidis G, Gidley MJ** (2004) Mechanical effects of plant cell wall enzymes on cellulose/xyloglucan composites. *Plant J* 38: 27-37
- Chengappa S, Hellyer SA, de Silva J, Reid JSG**, inventors. 14 March, 1996. Xyloglucan specific beta-galactosidase. International Application Number PCT/GB95/02098
- Choi D, Cho HT, Lee Y** (2006) Expansins: expanding importance in plant growth and development. *Physiologia Plantarum* 126: 511-518
- Corpet F** (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16: 10881-10890
- Cosgrove DJ** (1987) Wall relaxation and the driving forces for cell expansive growth. *Plant Physiol* 84: 561-564
- Cosgrove DJ** (1993) How do plant cell wall extend? *Plant Physiol* 102: 1-6
- Cosgrove DJ** (2000) Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407: 321-326
- Cosgrove DJ** (2001) Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant Physiol* 125: 131-134
- Coutinho P, Henrissat B** (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. Recent advances in carbohydrate bioengineering: 3-12
- Creelman RA, Mullet JE** (1997) Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *Plant Cell* 9: 1211-1223
- Crombie HJ, Chengappa S, Hellyer A, Reid JS** (1998) A xyloglucan oligosaccharide-active, transglycosylating beta-D-glucosidase from the cotyledons of nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) seedlings purification, properties and characterization of a cDNA clone. *Plant J* 15: 27-38
- Darley CP, Forrester AM, Queen-Mason SJ** (2001) The molecular basis of plant cell wall extension. *Plant Molecular Biology* 47: 179-195
- Davies G, Henrissat B** (1995) Structures and mechanism of glycosyl hydrolases. *Structure* 3: 853-859
- de Alcantara PHN, Martim L, Silva CO, Dietrich SMC, Buckeridge MS** (2006) Purification of a [beta]-galactosidase from cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae). Enzyme properties and biological function. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 619-627

- de la Torre F, Sampedro J, Zarra I, Revilla G** (2002) AtFXG1, an Arabidopsis gene encoding alpha-L-fucosidase active against fucosylated xyloglucan oligosaccharides. *Plant Physiol* 128: 247-255
- de Silva J, Jarman CD, Arrowsmith DA, Stronach MS, Chengappa S, Sidebottom C, Reid JSG** (1993) Molecular characterization of a xyloglucan-specific endo-(1-4)- $\alpha$ -D-glucanase (xyloglucan endotransglycosylase) from nasturtium seeds. *Plant J* 3: 701-711
- del Campillo E** (1999) Multiple endo-1,4-beta-D-glucanase (cellulase) genes in Arabidopsis. *Curr Top Dev Biol* 46: 39-61
- Delmer DP** (1999) Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 245-276
- Dey PM, del Campillo E** (1984) Biochemistry of the multiple forms of glycosidases in plants. *Advances in Enzymology* 56: 141-249
- Dopico B, Nicolás G, Labrador E** (1990) Changes during epicotyl growth of an autolysis-related  $\beta$ -galactosidase from the cell wall of *Cicer arietinum*. *Plant Science* 72: 45-51
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Roberts PA, Smith F** (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356
- Edwards M, Bowman YJ, Dea IC, Reid JS** (1988) A beta-D-galactosidase from nasturtium (*Tropaeolum majus* L) cotyledons. Purification, properties, and demonstration that xyloglucan is the natural substrate. *J Biol Chem* 263: 4333-4337
- Edwards M, Dea ICM, Bulpin PV, Reid JSG** (1985) Xyloglucan (amyloid) mobilisation in the cotyledons of *Tropaeolum majus* L. seeds following germination. *Planta* 163: 133-140
- Edwards M, Dea ICM, Bulpin PV, Reid JSG** (1986) Purification and properties of a novel xyloglucan-specific endo-(1,4)- $\alpha$ -D-glucanase from germinated nasturtium seeds (*Tropaeolum majus* L). *J Biol Chem* 261: 9489-9494
- Edwards M, Bowman YJ, Dea IC, Reid JS** (1988) A beta-D-galactosidase from nasturtium (*Tropaeolum majus* L) cotyledons. Purification, properties, and demonstration that xyloglucan is the natural substrate. *J Biol Chem* 263: 4333-4337
- Esteban R, Dopico B, Muñoz FJ, Romo S, Martín I, Labrador E** (2003) Cloning of *Cicer arietinum* beta-galactosidase with pectin-degrading function. *Plant Cell Physiol* 44: 718-775
- Esteban R, Labrador E, Dopico B** (2005) A family of  $\beta$ -galactosidase cDNAs related to

- development of vegetative tissue in *Cicer arietinum*. Plant Science 168: 457-466
- Faik A, Chilesche C, Sterling J, Maclachlan G** (1997) Xyloglucan galactosyl and fucosyltransferase activities from pea epicotyl microsomes. Plant Physiol 114: 245-254
- Faik A, Price NJ, Raikhel NV, Keegstra K** (2002) An Arabidopsis gene encoding an alpha-xylosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99: 7797-7802
- Fanutti C, Gidley MJ, Reid JSG** (1993) Action of a pure xyloglucan endotransglycosylase formerly called xyloglucan-specific endo-(1-4)- $\alpha$ -D-glucanase from the cotyledons of germinated nasturtium seeds. Plant J 3: 691-700
- Fanutti C, Gidley MJ, Reid JSG** (1991) A xyloglucan-oligosaccharide-specific  $\alpha$ -D-xylosidase or exo-oligoxyloglucan- $\alpha$ -xylohydrolase from germinated nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) seeds. Purification, properties and its interaction with a xyloglucan-specific endo-(1,4)- $\alpha$ -D-glucanase and other hydrolases during storage xyloglucan mobilisation. Planta 184: 137-147
- Fanutti C, Gidley MJ, Reid JSG** (1996) Substrate subsite recognition of the xyloglucan endo-transglycosylase or xyloglucan-specific endo-(1-4)- $\alpha$ -D-glucanase from the cotyledons of germinated nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) seeds. Planta 200: 221-228
- Farkas V, Hanna R, Maclachlan G** (1991) Xyloglucan oligosaccharide  $\alpha$ -L-fucosidase activity from growing pea stems and germinating nasturtium seeds. Phytochemistry 30: 3202-3207
- Farkas V, Sulova Z, Stratilova E, Hanna R, Maclachlan G** (1992) Cleavage of xyloglucan by nasturtium seed xyloglucanase and transglycosylation to xyloglucan subunit oligosaccharides. Arch Biochem Biophys 298: 365-370
- Fedoroff NV, Smith DL** (1993) A versatile system for detecting transposition in Arabidopsis. Plant J 3: 273-289
- Fincher GB, Stone BA, Clarke AE** (1983) Arabinogalactan proteins: structure, biosynthesis, and function. Annual Review of Plant Physiology 34: 47-70
- Fleischer A, O'Neill MA, Ehwald R** (1999) The Pore Size of Non-Graminaceous Plant Cell Walls Is Rapidly Decreased by Borate Ester Cross-Linking of the Pectic Polysaccharide Rhamnogalacturonan II. Plant Physiol 121: 829-838

- Fleming AJ, Caderas D, Wehrli E, McQueen-Mason S, Kuhlemeier C** (1999) Analysis of expansin-induced morphogenesis of the apical meristem of tomato. *Planta* 208: 166-174
- Fry SC** (1986) In-vivo formation of xyloglucan nonasaccharide: a possible biologically active cell-wall fragment. *Planta* 169: 443-453
- Fry SC** (1988) *The Growing Plant Cell Wall: Chemical and Metabolic Analysis*. Longman Scientific & Technical
- Fry SC** (1989) The structure and function of xyloglucan. *J Exp Bot* 40: 1-11
- Fry SC** (1995) Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 497-520
- Fry SC** (1998) Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemical Journal* 332: 507-515
- Fry SC** (2004) Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist* 161: 641-675
- Fry SC, Aldington S, Etherington PR, Aitken J** (1993) Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. *Plant Physiol* 103: 1-5
- Fry SC, Smith RC, Renwick KF, Martin DJ, Hodje SK, Matthews KJ** (1992) Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochemical Journal* 282: 821-828
- Gantulga D, Turan Y, Bevan DR, Esen A** (2008) The Arabidopsis At1g45130 and At3g52840 genes encode  $\beta$ -galactosidases with activity toward cell wall polysaccharides. *Phytochemistry* 69: 1661-1670
- Gebler J, Gilkes NR, Claeysens M, Wilson DB, Beguin P, Wakarchuk WW, Kilburn DG, Miller RCJ, Warren RA, Withers SG** (1992) Stereoselective hydrolysis catalyzed by related  $\alpha$ -1,4-glucanases and  $\alpha$ -1,4-xylanases. *J Biol Chem* 267: 12559-12561
- Gibeaut DM** (2000) Nucleotide sugars and glycosyltransferases for synthesis of cell wall matrix polysaccharides. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 69-80
- Gillmor CS, Poindexter P, Lorieau J, Palcic MM, Somerville C** (2002)  $\alpha$ -Glucosidase I is required for cellulose biosynthesis and morphogenesis in Arabidopsis. *Journal of Cell Biology* 156: 1003-1013
- Goldberg R** (1985) Cell wall isolation, general growth aspects. *Modern methods of plant analysis* 30

- Goujon T, Minic Z, El Amrani A, Lerouxel O, Aletti E, Lapierre C, Joseleau JP, Jouanin L** (2003) AtBXL1, a novel higher plant (*Arabidopsis thaliana*) putative beta-xylosidase gene, is involved in secondary cell wall metabolism and plant development. *Plant J* 33: 677-690
- Guillen R, York WS, Pauly M, Impalloment G, Albersheim P, Darvill AG** (1995) Metabolism of xyloglucan generates xylose-deficient oligosaccharide subunits of this polysaccharide in etiolated peas. *Carbohydrate Research* 277: 291-311
- Hanus J, Mazeau K** (2006) The xyloglucan-cellulose assembly at the atomic scale. *Biopolymers* 82: 59-73
- Hayashi T, MacLachlan G** (1984) Pea xyloglucan and cellulose: III. Metabolism during lateral expansion of pea epicotyl cells. *Plant Physiol* 76: 739-746
- Hayashi T** (1989) Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 139-168
- Hayashi T, Marsden MPF, Delmer DP** (1987) Pea xyloglucan and cellulose V. Xyloglucan-cellulose interactions in vitro and in vivo. *Plant Physiol* 83: 384-389
- Hayashi T, Ogawa K, Mitsuishi Y** (1994) Characterization of the adsorption of xyloglucan to cellulose. *Plant Cell Physiol* 35: 1199-1205
- Hayashi T, Wong Y, MacLachlan G** (1984) Pea xyloglucan and cellulose II. Partial hydrolysis by pea endo-1,4- $\alpha$ -glucanases. *Plant Physiol* 75: 605-610
- Henrissat B** (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 280: 309-316
- Henrissat B, Bairoch A** (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 293: 781-788
- Henrissat B, Bairoch A** (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal* 316: 695-696
- Henrissat B, Davies G** (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol* 7: 637-644
- Henrissat B** (1998) Glycosidase families. *Biochemical Society Transactions* 23: 153-156
- Hoffman M, Jia ZH, Pena MJ, Cash M, Harper A, Blackburn AR, Darvill A, York WS** (2005) Structural analysis of xyloglucans in the primary cell walls of plants in the subclass Asteridae. *Carbohydrate Research* 340: 1826-1840

- Hood EH, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekma A** (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transg Res* 2: 208-218
- Iglesias N, Abelenda JA, Rodino M, Sampedro J, Revilla G, Zarra I** (2006) Apoplastic glycosidases active against xyloglucan oligosaccharides of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 47: 55-63
- Ito T, Motohashi R, Kuromori T, Mizukado S, Sakurai T, Kanahara H, Seki M, Shinozaki K** (2002) A New Resource of Locally Transposed Dissociation Elements for Screening Gene-Knockout Lines in Silico on the Arabidopsis Genome. *Plant Physiol* 129: 1695-1699
- Jarvis MC** (1984) Structure and properties of pectins gels in plant cell walls. *Plant Cell and Environment* 7: 153-164
- Jefferson RA, Kavanaugh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker for higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901-3907
- Keegstra K, Albersheim P** (1970) The Involvement of Glycosidases in the Cell Wall Metabolism of Suspension-cultured *Acer pseudoplatanus* Cells. *Plant Physiol* 45: 675-678
- Keller B** (1993) Structural Cell Wall Proteins. *Plant Physiol* 101: 1127-1130
- Kemsley EK** (1998) Discriminant analysis of spectroscopic data. Chichester, UK: John Wiley and sons
- Kimura S, Laosinchai W, Itoh T, Cui X, Linder C, Brown R** (1999) Immunogold labelling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna Angularis*. *Plant Cell* 11: 2075-2086
- King GA, Davies KM** (1995) Cloning of a Harvest-Induced  $\beta$ -Galactosidase from Tips of Harvested Asparagus Spears. *Plant Physiol* 108: 419-420
- Konno H, Yamasaki Y, Katoh K** (1986) Purification and characterization of  $\beta$ -galactosidase from cell suspension cultures of *Marchantia polymorpha*. *Plant Science* 44: 97-104
- Koyama T, Hayashi T, Kato Y, Matsuda K** (1981) Degradation of Xyloglucan by Wall-bound Enzymes from Soybean Tissue I. Occurrence of Xyloglucan-degrading Enzymes in Soybean Cell Wall. *Plant Cell Physiol* 22: 1191-1198
- Kulikova AK, Gomarteli MM, Tsereteli AK, Kvesitadze GI, Bilai TI** (1990)  $\beta$ -Galactosidases of lower eukaryotes. *Applied Biochemistry and Microbiology* 25: 621-632

- Kumar MNVR, Kumar N** (2001) Polymeric controlled drug-delivery systems: Perspective issues and opportunities. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 27: 1-30
- Lampert DTA, Epstein L** (1983) A new model of the primary cell wall: a concatenated extensin-cellulose network. *Curr Opin Plant Biol* 2: 73-83
- Lampert DTA, Kieliszewski MJ** (1994) A gene encoding a novel glycin-rich structural protein of petunia. *Plant J* 5: 157-172
- Lapasin R, Prici S** (1995) *The Rheology of Industrial Polysaccharides Theory and Applications*. Blackie Academic and Professional.
- Lerouxel O, Choo TS, Seveno M, Usadel B, Faye L, Lerouge P, Pauly M** (2002) Rapid structural phenotyping of plant cell wall mutants by enzymatic oligosaccharide fingerprinting. *Plant Physiol* 130: 1754-1763
- Levy S, Maclachlan G, Staehelin LA** (1997) Xyloglucan sidechains modulate binding to cellulose during *in vitro* binding assays as predicted by conformational dynamics simulations. *Plant J* 11: 373-386
- Levy S, York WS, Stuike-Prill R, Meyer B, Staehelin LA** (1991) Simulations of the static and dynamic molecular conformations of xyloglucan. The role of fucosylated sidechain in surface-specific sidechain folding. *Plant J* 11: 373-386
- Link BM, Cosgrove DJ** (1998) Acid-growth response and  $\alpha$ -expansins in suspension cultures of bright yellow 2 tobacco. *Plant Physiol* 118: 907-916
- Lloyd C, Chan J** (1989) Microtubules and the shape of the plants to come. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 13-22
- Lorences EP, Acebes JL, Revilla G, Zarra I** (1989) Changes in pectic and hemicellulosic polysaccharides during acid pH-induced growth in pine hypocotyl segments. *Plant Science* 62: 53-61
- Lorences EP, Fry SC** (1993) Xyloglucan oligosaccharides with at least two  $\alpha$ -D-xylose residues act as acceptor substrates for xyloglucan endotransglycosylase and promote the depolymerization of xyloglucan. *Physiologia Plantarum* 88: 105-112
- Lorences EP, McDougall GJ, Fry SC** (1990) Xyloglucan- and cello-oligosaccharides: antagonists of the growth-promoting effect of H<sup>+</sup>. *Physiologia Plantarum* 80: 109-113
- Lorences EP, Zarra I** (1987) Auxin-induced growth in hypocotyl segments of *Pinus pinaster* Aiton. Changes in molecular weight distribution of hemicellulosic polysaccharides. *J Exp Bot* 38: 960-967



- Madson M, Dunand C, Li XM, Verma R, Vanzin GF, Calplan J, Shoue DA, Carpita NC, Reiter WD** (2003) The MUR3 gene of Arabidopsis encodes a xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionarily related to animal exostosins. *Plant Cell* 15: 1662-1670
- Masuda H, Ozeki Y, Amino Si, Komamine A** (1985) Changes in the Activities of Various Glycosidases during Carrot Cell Elongation in a 2,4-D-Free Medium. *Plant Cell Physiol* 26: 995-1001
- Matsumoto T, Hirano M, Kiyohara H, Yamada H** (1995) Characterisation of the endopolygalacturonase-resistant region of the pectin from *Bupleurum falcatum* L. a polysaccharide with an active function in clearance of immune complexes. *Carbohydrate Research* 270: 221-229
- McCann MC, Wells B, Roberts K** (1990) Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *Journal of Cell Science* 96: 323-334
- McCarter JD, Withers SG** (1994) Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol* 4: 885-892
- McDougall GJ, Fry SC** (1991) Xyloglucan nonasaccharide, a naturally-occurring oligosaccharin, arises in vivo by polysaccharide breakdown. *Journal of Plant Physiology* 137: 332-336
- McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ** (1992) Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* 4: 1425-1433
- McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ** (1993) The relationship between xyloglucan endotransglycosylase and *in vitro* cell wall extension in cucumber hypocotyls. *Planta* 190: 327-331
- Miedes E, Lorences EP** (2004) Apple (*Malus domestica*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits cell-wall hemicelluloses and xyloglucan degradation during *Penicillium expansum* infection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 7957-7963
- Minic Z, Jouanin L** (2006) Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 435-449
- Monroe JD, Gough CM, Chaudler LE, Loch CM, Ferrante JE, Wright PW** (1999) Structure properties and tissue localization of apoplastic  $\alpha$ -glucosidase in crucifers. *Plant Physiol* 119: 385-397
- Murray AK, Bandurski RS** (1975) Correlative Studies of Cell Wall Enzymes and Growth. *Plant Physiol* 56: 143-147

- Mouille G, Robin S, Lecomte M, Pagant S, Höfte H** (2003) Classification and identification of Arabidopsis cell wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy. *Plant J* 35: 393-404
- Nakai K, Kanehisa M** (1992) A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* 14: 897-911
- Nishitani K** (1997) The role of endoxyloglucan transferase in the organization of plant cell walls. *International Review of Cytology - A Survey of Cell Biology*, Vol 173: 157-206
- Nishitani K** (1998) Construction and restructuring of the cellulose-xyloglucan framework in the apoplast as mediated by the xyloglucan-related protein family-A hypothetical scheme. *Journal of Plant Research* 111: 159-166
- Nishitani K, Masuda Y** (1981) Auxin-induced changes in the cell wall structure: changes in the sugar compositions, intrinsic viscosity and molecular weight distributions of matrix polysaccharides of the epicotyl cell wall of *Vigna angularis*. *Physiologia Plantarum* 52: 482-494
- Nishitani K, Masuda Y** (1983) Auxin-induced changes in the cell wall xyloglucans: Effects of auxin on the two different subfractions of xyloglucans in the epicotyl cell wall of *Vigna angularis*. *Plant Cell Physiol* 24: 345-355
- Nishitani K, Tominaga R** (1991) In vitro molecular weight increase in xyloglucans by an apoplastic enzyme preparation from epicotyls of *Vigna angularis*. *Physiologia Plantarum* 82: 490-497
- Nishitani K, Tominaga T** (1992) Endoxyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalysis transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *J Biol Chem* 267: 21058-21064
- Ohmiya Y, Samejima M, Shiroishi M, Amano Y, Kanda T, Sakai F, Hayashi T** (2000) Evidence that endo-1,4- $\alpha$ -glucanases act on cellulose in suspension-cultured poplar cells. *Plant J* 24: 147-158
- Ohmiya Y, Takeda T, Nakamura S, Sakai F, Hayashi T** (1995) Purification and properties of a wall-bound endo-1,4- $\alpha$ -glucanase from suspension-cultured poplar cells. *Plant J* 24: 147-158
- Okazawa K, Sato Y, Nakagawa T, Asada K, Kato I, Tomita E, Nishitani K** (1993) Molecular cloning and cDNA sequencing of endoxyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that mediates molecular

- grafting between matrix polysaccharides in plant cell walls. *J Biol Chem* 268: 25364-25368
- O'Donoghue E, Huber D** (1992) Modification of matrix polysaccharides during avocado (*Persea ameicana*) fruit ripening: an assessment of the role of the role of Cx-cellulase. *Physiologia Plantarum* 86: 33-42
- O'Neill R, Albersheim P, Darvill AG** (1989) Purification and characterization of a xyloglucan oligosaccharide-specific xylosidase from pea seedlings. *J Biol Chem* 260: 20430-20437
- Pear J, Kawagoe Y, Schreckengost W, Delmer DP, Stalker DM** (1996) Higher plants contains homologs of the bacterial CexA genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase. *PNAS* 93: 12637-12642
- Peng L, Kawagoe Y, Hogan P, Delmer D** (2002) Sitosterol- $\alpha$ -glucoside as a primer for cellulose synthesis in plants. *Science* 295: 147-150
- Pennell RI, Knox JP, Scofield GN, Selvendran RR, Roberts K** (1989) A family of abundant plasma membrane-associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants. *Journal of Cell Biology* 108: 1967-1977
- Pennell RI, Roberts K** (1990) Sexual development in pea is presaged by altered expression of arabinogalactan protein. *Nature* 344: 547-549
- Peña MJ, Ryden P, Madson M, Smith AC, Carpita NC** (2004) The galactose residues of xyloglucan are essential to maintain mechanical strength of the primary cell walls in *Arabidopsis* during growth. *Plant Physiol* 134: 443-451
- Perrin RM, Jia ZH, Wagner TA, O'Neill MA, Sarria R, York WS, Raikhel NV, Keegstra K** (2003) Analysis of xyloglucan fucosylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 132: 768-778
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 29: 2002-2007
- Potter I, Fry SC** (1993) Xyloglucan endotransglycosylase activity in pea internodes. *Plant Physiol* 103: 235-245
- Rayle DL, Houghton PM, Cleland R** (1970) An *in vitro* system that simulates plant cell extension growth. *PNAS* 67: 1814-1817
- Reid JSG** (1984) Cell wall storage carbohydrates in seeds- Biochemistry of the seed "gums" and "hemicelluloses". *Adv bot res* 11: 125-155
- Reid JSG, Edwards M, Dea ICM** (1988) Enzymatic modification of natural seed gums. GO Phillips, DJ Wedlock, PA Williams, eds,

- Gums and Stabilizers for the Food Industry 391-398
- Reiter WD, Chapple C, Somerville C** (1997) Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition. Plant J 12: 335-345
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D** (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. Phytochemistry 57: 929-967
- Robert S, Mouille G, Höfte H** (2004) The mechanism and regulation of cellulose synthesis in primary walls: lessons from cellulose-deficient *Arabidopsis* mutants. Cellulose 11: 351-364
- Roland JC, Vian B, Reis D** (1977) Further observations on cell wall morphogenesis and polysaccharide arrangement during plant growth. Protoplasma 91: 125-141
- Rose JKC, Braam J, Fry SC, Nishitani K** (2002b) The XTH Family of Enzymes Involved in Xyloglucan Endotransglucosylation and Endohydrolysis: Current Perspectives and a New Unifying Nomenclature. Plant Cell Physiol 43: 1421-1435
- Rose JKC, Braam J, Fry SC, Nishitani K** (2002a) The XTH Family of Enzymes Involved in Xyloglucan Endotransglucosylation and Endohydrolysis: Current Perspectives and a New Unifying Nomenclature. Plant Cell Physiol 43: 1421-1435
- Ryan CA** (1990) Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. Annu Rev Phytopathol 28: 425-449
- Ryden P, Sugimoto-Shirasu K, Smith AC, Findlay K, Reiter WD, Mccann MC** (2003) Tensile properties of *Arabidopsis* cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes. Plant Physiol 132: 1033-1040
- Saitou N, Nei M** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4: 406-425
- Sampedro J, Sieiro C, Revilla G, Gonzalez-Villa T, Zarra I** (2001) Cloning and expression pattern of a gene encoding an alpha-xylosidase active against xyloglucan oligosaccharides from *Arabidopsis*. Plant Physiol 126: 910-920
- Sanchez M, Gianzo C, Sampedro J, Revilla G, Zarra I** (2003) Changes in alpha-xylosidase during intact and auxin-induced growth of pine hypocotyls. Plant Cell Physiol 44: 132-138
- Savaldi-Goldstein S, Peto C, Chory J** (2007) The epidermis both drives and restricts plant shoot growth. Nature 446: 199-202

- Scheible WR, Pauly M** (2004) Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 285-295
- Schrack K, Fujioka S, Takatsuto S, Stierhof Y, Stransky H, Yoshida S, Jürgens G** (2004) A link between sterol biosynthesis, the cell wall, and cellulose in *Arabidopsis*. *Plant J* 38: 227-243
- Serpe MD, Nothnagel EA** (1995) Fractionation and structural characterization of arabinogalactan-proteins from the cell wall of rose cells. *Plant Physiol* 109: 1007-1016
- Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G, McElver J, Patton D, Dietrich B, Ho P, Bacwaden J, Ko C, Clarke JD, Cotton D, Bullis D, Snell J, Miguel T, Hutchison D, Kimmerly B, Mitzel T, Katagiri F, Glazebrook J, Law M, Goff SA** (2002) A High-Throughput *Arabidopsis* Reverse Genetics System. *Plant Cell* 14: 2985-2994
- Showalter AM** (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5: 9-23
- Sinnott ML** (1990) Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem Rev* 90: 1171-1202
- Smith DL, Gross KC** (2000) A Family of at Least Seven beta -Galactosidase Genes Is Expressed during Tomato Fruit Development. *Plant Physiol* 123: 1173-1184
- Sneath PHA, Sokal RR** (1973) Numerical taxonomy. San Francisco.
- Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, Paredes A, Persson S, Raab T, Vorwerk S, Youngs H** (2004) Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. *Science* 306: 2206-2211
- Stafstrom JP, Staehelin LA** (1988) Antibody localization of extensin in cell walls of carrot storage roots. *Plant J* 174: 321-332
- Taiz L** (1984) Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 585-657
- Takano M, Fujii N, Higashitani A, Nishitani K, Takahashi H** (1999) Endoxyloglucan transferase c142DNA isolated from pea roots and its fluctuating expression in hydroponically responding roots. *Plant Cell Physiol* 40: 135-142
- Takashi K, Takashi H, Yuki K, Hiroko T, Saho M, Tetsuya S, Kenji A, Takuya I, Kazuo S** (2004) A collection of 11800 single-copy *DS* transposon insertion lines in *Arabidopsis*. *Plant J* 37: 897-905
- Talbott LD, Ray PM** (1992) Molecular size and separability features of pea cell wall polysaccharides. Implications of models of

primary wall structure. *Plant Physiol* 92: 357-386

**Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 11: 4673-4680

**Thompson JE, Fry SC** (2000) Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta* 211: 275-286

**Thompson JE, Fry SC** (2001) Restructuring of wall-bound xyloglucan by transglycosylation in living plant cells. *Plant J* 26: 23-34

**Trainotti L, Spinello R, Piovan A, Spolaore S, Casadoro G** (2001) {beta}-Galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry. *J Exp Bot* 52: 1635-1645

**Van Sandt VST, Suslov D, Verbelen JP, Vissenberg K** (2007) Xyloglucan Endotransglucosylase Activity Loosens a Plant Cell Wall. *Ann Bot* 100: 1467-1473

**Vanzin GF, Madson M, Carpita NC, Raikhel NV, Keegstra K, Reiter WD** (2002) The *mur2* mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3340-3345

**Vincken JP, York WS, Beldman G, Voragen AGJ** (1997) Two general branching patterns of xyloglucan, XXXG and XXGG. *Plant Physiol* 114: 9-13

**Vissenberg K, Oyama M, Osato V, Yokoyama R, Verbelen JP, Nishitani K** (2005) Differential expression of AtXTH17, AtXTH18, AtXTH19 and AtXTH20 genes in Arabidopsis roots. Physiological roles in specification in cell wall construction. *Plant Cell Physiol* 46: 192-200

**Warneck H, Seitz HU** (1993) Inhibition of gibberellic acid-induced elongation-growth of pea epicotyls by xyloglucan oligosaccharides. *J Exp Bot* 44: 1105-1109

**Weigel D, Glazebrook J** (2002) *Arabidopsis thaliana*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (ed) A Laboratory Manual 241-248

**Ye ZH, Song YR, Marcus A, Varner JE** (1991) Comparative localization of three classes of cell wall proteins. *Plant J* 1: 175-183

**York WS, Harvey LK, Guillen R, Albersheim P, Darvill AG** (1993) Structural analysis of tamarind seed xyloglucan oligosaccharides using  $\alpha$ -galactosidase digestion and spectroscopic methods. *Carbohydrate Research* 248: 285-301

**York WS, Kolli VSK, Orlando R, Albersheim P, Darvill AG** (1996) The structures of

arabinoxylglucans produced by solanaceous plants. Carbohydrate Research 285: 99-128

**York WS, Darvill AG, Albersheim P** (1984) Inhibition of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid-Stimulated Elongation of Pea Stem Segments by a Xyloglucan Oligosaccharide. Plant Physiol 75: 295-297

**Zabackis E, Huang J, Muller B, Darvill AG, Albersheim P** (1995) Characterization of the cell wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. Plant Physiol 107: 1129-1138

**Zarra I, Sanchez M, Queijeiro E, Peña MJ, Revilla G** (1999) The cell wall stiffening mechanism in *Pinus pinaster* Aiton: Regulation by apoplastic levels of ascorbate and hydrogen peroxide. J Sci Food Agric 79: 416-420

**Zechel DL, Withers SG** (2000) Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. Acc Chem Res 33: 11-18

**Zhang GF, Staehelin LA** (1992) Functional compartment of the Golgi apparatus of plant cells. Plant Physiol 99: 1070-1083

**Zhong R, Burk DH, Morrison WH, III, Ye ZH** (2004) FRAGILE FIBER3, an Arabidopsis Gene Encoding a Type II Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase, Is Required for Secondary Wall Synthesis and Actin Organization in Fiber Cells. Plant Cell 16: 3242-3259

**Zuo J, Niu Q.W., Nishizawa N, Wu Y, Kost B, Chua NH** (2000) KORRIGAN, an Arabidopsis endo-1,4- $\alpha$ -glucanase, localizes to the cell plate by polarized targeting and is essential for cytokinesis. Plant Cell 12: 1137-1152